

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
FARMACOLOGIA**

**Maíra Assunção Bicca**

**A PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRPA1 NA  
TOXICIDADE INDUZIDA POR OLIGÔMEROS DE  
BETA-AMILÓIDE EM DIFERENTES MODELOS  
EXPERIMENTAIS: UM POTENCIAL NOVO ALVO  
PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER**

**Florianópolis, 2016**



**Maíra Assunção Bicca**

**A PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRPA1 NA  
TOXICIDADE INDUZIDA POR OLIGÔMEROS DE  
BETA-AMILÓIDE EM DIFERENTES MODELOS  
EXPERIMENTAIS: UM POTENCIAL NOVO ALVO  
PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER**

Tese apresentada ao Programa de  
Pós- Graduação em Farmacologia,  
Centro de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal de Santa  
Catarina, em cumprimento ao  
requisito parcial para a obtenção  
do título de Doutora em  
Farmacologia.

Orientador: Dr. João Batista Calixto  
Orientador do período Sanduíche: Dr. William Klein

**Florianópolis, 2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bicca, Máira Assunção

A participação do receptor TRPA1 na toxicidade induzida por oligômeros de beta-amilóide em diferentes modelos experimentais: um potencial novo alvo para a doença de Alzheimer / Máira Assunção Bicca ; orientador, João Batista Calixto - Florianópolis, SC, 2016.

278 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. receptor TRPA1. 3. doença de Alzheimer. 4. neuroinflamação. 5. estresse oxidativo. I. Calixto, João Batista. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.



**"A participação do receptor TRPA1 na toxicidade induzida por oligômeros de beta-amilóide em diferentes modelos experimentais: um potencial novo alvo para a doença de Alzheimer"**

Por

**Maíra Assunção Bicca**

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (12/PPGPMC/2016) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro de Lima  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

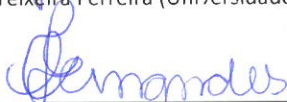
Banca examinadora:



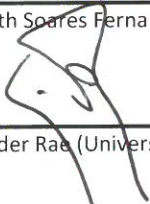
Dr(a) João Batista Calixto (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)



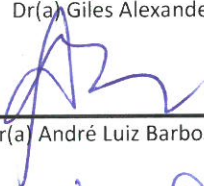
Dr(a) Sérgio Teixeira Ferreira (Universidade Federal do Rio de Janeiro)



Dr(a) Elizabeth Soares Fernandes (Universidade CEUMA)



Dr(a) Giles Alexander Rae (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) André Luiz Barbosa Báfica (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Rui Daniel Schroder Prediger (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 12 de Abril de 2016.



*A todos os professores  
que me inspiraram ao  
longo da jornada, dentre  
eles, os mais especiais,  
minha mãe Vera  
Assunção e meu pai  
Jeferson Bicca.*



## AGRADECIMENTOS

Ao Professor João Batista Calixto, um homem de fibra e empreendedor, um cientista visionário e único, que me conheceu quando eu tinha apenas 18 anos, quando entrei em seu laboratório para estagiar como iniciação científica. Ao longo de quase 10 anos, aprendi com ele que um cientista de verdade tem que ter brilho no olho, que um cientista de verdade tem que ler, ler, ler e ler de novo, e que deve ter foco. Muito obrigada pela paciência, determinação e confiança quem foram em mim depositadas. Sou grata a ele por tudo que aprendi para a ciência e para vida. Ao orientador que me proporcionou ver o mundo com outros olhos.

Ao Professor William Klein, meu orientador no período sanduíche de Junho de 2013 a Junho de 2014, da *Northwestern University*, campus Evanston, Illinois, EUA. A pessoa que confiou em mim e no meu trabalho desde o primeiro momento, e que me proporcionou discussões riquíssimas sobre a doença de Alzheimer, e sobre todas as hipóteses levantadas durante a realização deste estudo. A pessoa que me tratou de igual para igual, me ouviu, me contestou, me incentivou e me desafiou. Muito obrigada por ser o melhor orientador americano que eu poderia ter.

À Professora Thereza Christina Monteiro de Lima, por me adotar como sua e me fazer parte do seu lab. Estimo muito a sua confiança em mim, e por acreditar na minha capacidade técnica e intelectual, sempre. Com esta professora aprendi muitas lições, e sinto que cresci como profissional e mulher de garra, espelhando-me no seu esforço para fazer melhor.

À minha mãe Vera Lúcia, ao meu pai Jeferson e ao meu irmão Saul. A família sempre é a base de tudo. É um eterno aprendizado e um amor incondicional. Os meus referenciais, orgulhos e exemplos. Uma casa começa sempre pela fundação. Como gosto sempre de dizer, aos que deram asas aos meus sonhos, por acreditarem e alimentarem o meu potencial.

Ao meu namorado Yuri, com ele escolhi dividir a vida, os momentos bons e os difíceis, os de alegria e os de tristeza. Durante 6 anos – 2 anos de mestrado e os 4 anos deste doutorado – dividimos muitos desses momentos juntos, e tenho certeza que o apoio integral me auxiliou de maneira vital, para chegar onde cheguei.

Aos meus sogros Maria Aparecida e Baldonado. A família sempre é a base de tudo, repito. Duas das pessoas mais íntegras que conheci e com quem convivi, que me deram o suporte material e espiritual necessário para ir além de qualquer barreira.

À Gecioni, amiga do peito, conselheira, mãe, mulher de fibra. Uma amizade que nasceu no início do doutorado dela e que permanecerá muito além do final do meu. Juntas passamos por momentos maravilhosos e também por momentos difíceis, o ditado diz, amigos são para essas coisas.

À Evelyn por todo o apoio e amizade. Como gosto de dizer, se eu fosse um neurônio ela seria meu astrócito. Uma pessoa maravilhosa, que me ensinou muitas lições nesta jornada, muitas vezes inconscientemente. Os dois meses que vivemos juntas nos EUA foram um intensivo da nossa vida. Agradeço a parceria, a fidelidade, o apoio e a paciência.

Às minhas fiéis colaboradoras e amigas Gecioni e Evelyn. Sem elas esta tese seria ainda uma tese, mas com toda certeza, teria sido muito mais difícil. Vocês fizeram meus dias mais alegres, minha ciência mais colorida e a minha vida mais cheia de momentos inesquecíveis. Muito obrigada pelo incentivo constante, pelo carinho, pela dedicação, pela paciência e por todas as palavras de apoio. Carregamos um legado científico juntas, mas principalmente uma amizade para a vida.

À minha melhor colaboradora americana e amiga Kirsten Viola. A mulher que me ensinou inglês, cultura, culinária, arte, história, ciência, dicas sobre a maternidade, geografia, diferenças climáticas, música, literatura e muitas outras coisas, mas que acima de tudo que me adotou como filha. Abriu a porta do seu coração para mim e compartilhou comigo um dos melhores anos do meu doutorado. Chicago nunca mais foi a mesma depois que conheci essa mulher de fibra. Sinto falta desta parceria e dos dias de neve.

Ao meu primeiro amigo nos EUA, Haoming Jiang, vulgo Daniel, e que sim é chinês. Uma das pessoas mais modestas com quem convivi e que me ensinou incontáveis lições de amizade e de respeito. Um pesquisador muito metódico e pragmático, um ser humano determinado e uma criança, que vivem no mesmo corpo. Um amigo para sempre.

Aos amigos que fiz no laboratório nos EUA e no departamento de Neurobiologia da *Northwestern University* e que deixaram em mim uma marca que jamais poderá ser apagada. Ao Matthew e à Michaela, mestrandos brilhantes e pessoas incríveis. Ao Kyle, Henry, Allan, Pascale, Pauline, Ivette, Setong, Sarah,

Yuchen, Warren, David, Cristine, Rish, Rashmi, Clarissa, Jordan, Brad, Oscar, Chang, Shiva, Jackie, Maryam, Erika, Bill, Paul, Jane, Alex e Susan, pelo apoio e por me aceitarem de maneira tão doce e receptiva.

Aos amigos que fiz no laboratório do professor Calixto, o antigo LAFEX. À Cláudia, Giselle, Maíra Cola, Daniela, Alice, Kathryn, Juliana Fabris, Ana Flávia, Eliziane, Kellen, Natália, Raquel, Fernanda, Edinéia, Juliana Chaves, Marianne, Fabiana e Gabriela. Ao Robson, Rodrigo Medeiros, Emerson, Jarbas, Rodrigo Marcon, Rafael, Alisson, Andrey e Luciano. Alguns deles permaneceram e hoje atuam no novo centro dirigido pelo professor Calixto, o CIEnP. Aproveito a oportunidade para agradecer aos novos amigos que fiz lá. Ao Victor, Cristina, Edir, Milliane, Melina, Gustavo, Camila, Franciele, Simone, Bruna, Maria Lúcia, Janine e a Fernanda, pelos momentos de convivência e alegria.

Em especial à Marianne, Fabiana e Gabriela Segat e ao Robson, juntos nós compomos os últimos momentos do laboratório do Professor Calixto. Juntos nós rimos, choramos e vibramos. Vocês fazem parte de uma história linda e que jamais esquecerei. Cada um foi importante à sua maneira para a realização, continuação e finalização deste doutorado. Muito obrigada.

Ao Filipe Matheus e a Evelyn, juntos nós somos 2 *and a half doctors*, juntos nós somos melhores. Sou grata por todo apoio na finalização deste processo. Se tudo der certo, teremos que mudar o nome desse grupo.

À Patrícia, ao Pedro e à Carolina os funcionários mais queridos que um laboratório poderia ter. Uma tese não é feita apenas de experimentos e pesquisa. Também



é feita de muitas burocracias, e por isso agradeço à Patrícia, por sempre estar disposta a ajudar quando precisei. É feita com animais bem cuidados, e por isso agradeço ao Pedro, pela gentileza, destreza e paciência em lidar com os animais experimentais, e ainda com os racionais. E é também feita por técnicos, e por isso agradeço à Carol, por ser sempre tão solícita e disposta e por administrar com habilidade o material necessário para a realização dos experimentos quando solicitada. Acima de tudo agradeço aos três pela amizade incondicional e pelo carinho e atenção. Ainda, agradeço à Juliana Gonçalves e à Aline Venâncio, que foram técnicas no laboratório e foram de ajuda essencial para a realização de alguns dos experimentos desta tese.

A todos os integrantes do LabThê e agregados, os ainda presentes, e aos que por lá já passaram, uma vez LabThê, sempre LabThê. À Ana Paula, Renata, Vagner, Felipe Vanz, Camila, Matheus, Gleyson Henrique, Gilli, Marcelo, Alexandre, Guilherme, Pablinny, Evelyn e Claudini, por me receberem com tanto carinho como parte deste laboratório, e por toda a ajuda dedicada a mim e dias de intensa felicidade, em momentos diferentes deste doutorado.

Em especial à Ana Paula, Claudini, Karina, Alexandre e Fernanda Hoeller, por serem únicos em toda esta jornada. Os momentos de alegria, de discussão científica, de discussão não-científica, de risos e de abraços são incontáveis. Estes amigos fizeram da minha volta ao Brasil, após o período sanduíche, um momento ímpar, que será para sempre guardado na memória.

À doutora Carmem Simeoni e à Professora Zenilda Bouzon pelo auxílio incondicional para a

realização da técnica de microscopia eletrônica de transmissão e por todos os momentos de troca de conhecimento e crescimento.

Aos funcionários do LAMEB que está situado no CCB, UFSC. Agradeço à Chirle, ao Demétrio, à Emily, à Vanessa, à Bibiana e ao Denis por sempre me receberem com muita solicitude e paciência. Pelo auxílio técnico em todos as análises realizadas no LAMEB e por compartilharem comigo a alegria de cada experimento que deu certo. Pela discussão e destreza nos momentos de ajuda para ajustar os protocolos quando os experimentos não deram certo.

Aos Professores Giles Alexander Rae, André Báfica e Rui Daniel Prediger por aceitarem avaliar esta tese. São pessoas que admiro muito, cada um na sua competência. Cientistas incríveis e inspiradores, pessoas que desafiam o limite do pensar e plantam sementes do saber. Não poderia estar mais honrada em tê-los como avaliadores do meu trabalho e da minha caminhada.

Aos Professores Sérgio T. Ferreira e Elizabeth Fernandes, da mesma maneira, por aceitarem avaliar este trabalho de conclusão de doutorado. São dois cientistas fantásticos que compreendem, em termos distintos, as vertentes principais deste trabalho. Pelos dois nutro profunda admiração e respeito.

A todos os alunos que fazem parte da minha turma de doutorado. À Ana Carolina, Karla, Franklin, Taciane, Paulo e Muryel. Juntos passamos por muitos momentos críticos de alegria e de tensão, e depois de quatro anos vejo o quanto nos aperfeiçoamos.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Farmacologia, pela contribuição a minha formação, engrandecimento pessoal e profissional. Orgulho-me de fazer parte de uma das poucas turmas de graduação em Farmácia que teve aula com praticamente todos os professores do departamento na época: Professor Anicleto, Giles, Tonussi, Jamil, Calixto, Rosa Maria, Takahashi, Tadeu, Pádua, Thereza, Leandro, Rui e Yara.

A todos os colegas do Departamento de Farmacologia, pós-doutorandos, em especial ao Filipe Matheus, aos doutores, aos doutorandos, em especial à Ana Paula Costa, ao Paulo Oliveira, à Flora Lucena e ao Franklin Back, mestres, mestrandos, em especial à Claudini de Pieri, ICs, técnicos, estagiários, secretárias, em especial à Sheila, faxineiras e faxineiros, em especial à Andréia e ao Sérgio, e seguranças. Muito obrigada por todas as conversas nos corredores, horas de alegria, momentos de desabafo, pelos sorrisos, por estarem presentes, por fazerem meus dias mais cheios de boas vibrações.

À esta universidade. A Universidade Federal de Santa Catarina, onde me formei desde a graduação, passando pelo mestrado e com muita satisfação, onde completo meu doutorado. Aqui tive oportunidades únicas de adquirir e compartilhar conhecimento, em diferente áreas. Conheci professores incríveis e tive, em muitas vezes, a oportunidade, mais tarde, de trabalhar com eles. Aqui eu desenvolvi muitas habilidades, aqui as portas do mundo se abriram diante dos meus olhos, no sentido real e figurado.

Às agências de financiamento CNPq, CAPES e FAPESC pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste trabalho e a minha formação acadêmica.

*“Successful persons find a way to  
get the job done, get it done right and  
get it done fast. Be successful!”*

***William Klein***



## RESUMO

O receptor TRPA1 pertence à superfamília dos receptores de potencial transitório (TRPs) e está expresso na medula espinhal e em outros tecidos, sendo reconhecido por mediar uma diversidade de processos dolorosos e inflamatórios. A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa caracterizada por acúmulo da proteína Tau e dos peptídeos A $\beta$ . A progressão desta doença incurável é diretamente afetada pelos processos de estresse oxidativo e neuroinflamação. Os produtos resultantes do processo inflamatório e oxidativo – como as espécies reativas de oxigênio (EROS) e o Ca<sup>+2</sup> em excesso – apresentam-se elevados no início, e durante, a progressão da DA. Destaca-se o fato de que estas moléculas endógenas, também são comprovados agonistas do receptor TRPA1. No entanto, o possível papel do TRPA1 na DA ainda é desconhecido. O objetivo deste trabalho de tese, portanto, foi investigar o possível papel do receptor TRPA1 em diferentes modelos animais relacionados a DA. Utilizamos neste trabalho diferentes abordagens experimentais: cultura de células primárias tratada com A $\beta$ Os, administração i.c.v. de A $\beta$ Os em camundongos *Swiss*, camundongos transgênicos (TG) 5XFAD e cérebros de humanos diagnosticados com a DA, e também, preparações distintas do peptídeo A $\beta$  (A $\beta$ Os<sub>40</sub> e A $\beta$ Os<sub>42</sub>). Foram realizadas avaliações comportamentais de aprendizado e memória em animais, através do teste do reconhecimento de objetos, e do teste de esQUIVA passiva *step down*. Além de, uma variedade de técnicas moleculares e bioquímicas, como por exemplo, a avaliação da formação de EROS, determinação do potencial de membrana mitocondrial, imunocitoquímica, imunofluorescência em fatias de cérebro, *western*

*blotting*, coimunoprecipitação, microscopia eletrônica de transmissão, entre outras. Os resultados demonstram a ampla expressão de TRPA1 em neurônios e nas microglias no encéfalo de camundongos, destacando ainda, a relevância do TRPA1 para a ligação de A $\beta$ Os às sinapses, e para a indução do estresse oxidativo e morte neuronal. Os achados evidenciam ainda, a relação entre o acúmulo dos A $\beta$ Os e a distribuição do TRPA1, em todas as abordagens experimentais utilizadas. Ademais, o aumento da expressão de TRPA1 na microglia e seu possível papel no processo inflamatório. O tratamento por via oral com o antagonista seletivo do TRPA1 (HC030031) apresenta efeito benéfico sobre a perda da memória, nos diferentes modelos animais utilizados neste trabalho, além de, reduzir a quantidade de placas e oligômeros de A $\beta$  e consequente melhoria do dano sináptico induzido por A $\beta$ Os. Baseados nestes dados, sugerimos que o receptor TRPA1 é relevante para a toxicidade induzida por A $\beta$ Os, sendo este receptor crucial para a patogênese DA e apresentando-se como um potencial novo alvo para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da doença.

Palavras-chave: receptor TRPA1; A $\beta$ Os; Doença de Alzheimer; Neuroinflamação; Estresse oxidativo;



## ABSTRACT

TRPA1 is a member of the transient receptor potential (TRP) superfamily well known to be expressed in the spinal horn and other tissues, and recognized to mediate a diversity of pain and inflammatory states. Alzheimer's disease (AD) is a degenerative disease characterized by accumulation of both tau and A $\beta$  peptides, and for having the disease course affected by progressive oxidative stress and brain inflammation. Products of inflammation, notably reactive oxygen species (ROS) and Ca<sup>2+</sup> are augmented during AD initiation and progression. Intriguingly, these are endogenous molecules known to be able to activate TRPA1. However, the possible role of TRPA1 in AD pathogenesis is still unknown and we aimed to investigate it. We used different approaches (primary cell culture treated with A $\beta$ Os, A $\beta$ Os-injected Swiss mice, 5XFAD TG AD mouse model and AD human brains; including respective controls to each) and also two distinct preparations A $\beta$ Os<sub>40</sub> and A $\beta$ Os<sub>42</sub>. Besides behavioral assessments, a variety of molecular and biochemical techniques, namely the evaluation of ROS formation, mitochondrial membrane potential determination, immunocytochemistry, immunofluorescence in brain slices, western blotting, co-immunoprecipitation, electron microscopy, and others. Here we report TRPA1 is largely expressed in neurons and microglia in the brain. TRPA1 is relevant to A $\beta$ Os binding and A $\beta$ Os-induced oxidative stress/death in neuronal cells. We demonstrated the correlation between the up-regulation and spreading of both A $\beta$ Os and TRPA1, in all the approaches used. Herein, we are also reporting TRPA1 augmented expression in the microglia and its possible role in the inflammation process. Of note, TRPA1 selective antagonist (HC030031) oral treatment

improved memory deficits in the different mouse models of approach. Besides, reduced A $\beta$  burden in plaques and oligomers with consequent improvement on A $\beta$ Os-induced synaptic loss. We propose TRPA1 as novel potential target to A $\beta$ Os-induced toxicity and further memory impairment, being essential to AD pathogenesis.

**Keywords:** TRPA1 channel; A $\beta$ Os-toxicity; Alzheimer's disease; Neuroinflammation; Oxidative stress;

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Processo proteolítico da APP.....	45
<b>Figura 2.</b> Estrutura de uma subunidade formadora do receptor TRPA1.....	53
<b>Figura 3.</b> Classificação dos TRPs em famílias.....	55
<b>Figura 4.</b> Estrutura química dos agonistas do receptor TRPA1.....	58
<b>Figura 5.</b> Estrutura química dos antagonistas do receptor TRPA1.....	59
<b>Figura 6.</b> Desenho esquemático do ensaio de ligação de A $\beta$ Os aos nanodiscos por <i>alpha screening</i> .....	113
<b>Figura 7.</b> Desenho esquemático das diferentes espinhas dendríticas.....	116
<b>Figura 8.</b> Expressão do receptor TRPA1 em diferentes tipos celulares encefálicos.....	120
<b>Figura 9.</b> Expressão do receptor TRPA1 em células neuronais.....	122
<b>Figura 10.</b> Expressão do receptor TRPA1 em sinaptossomas.....	123
<b>Figura 11.</b> Avaliação da participação do receptor TRPA1 na toxicidade induzida por A $\beta$ Os.....	127
<b>Figura 12.</b> Comparação entre a toxicidade induzida por A $\beta$ Os e os controles positivos dos ensaios.....	129
<b>Figura 13.</b> Avaliação da participação do receptor TRPA1 na morte neuronal induzida por A $\beta$ Os.....	131
<b>Figura 14.</b> Efeito dos diferentes compostos sobre a formação e/ou estabilização dos A $\beta$ Os.....	133
<b>Figura 15.</b> A ligação de A $\beta$ Os em cultura celular de neurônios que expressam o receptor TRPA1.....	136
<b>Figura 16.</b> Ensaio de coimunoprecipitação entre o receptor TRPA1 e os A $\beta$ Os.....	138
<b>Figura 17.</b> Controles realizados para os ensaios de coimunoprecipitação.....	139

<b>Figura 18.</b> Efeito do HC030031 sobre a ligação de A $\beta$ Os aos nanodiscos no ensaio de <i>alpha screening</i> .....	141
<b>Figura 19.</b> Curva concentração-resposta dos antagonistas e agonista do receptor TRPA1 no ensaio de ligação.....	143
<b>Figura 20.</b> Efeito do antagonista do receptor TRPA1 na ligação de A $\beta$ Os aos dendritos neuronais.....	145
<b>Figura 21.</b> Efeito do HC030031 na ligação dos A $\beta$ Os aos dendritos neuronais.....	146
<b>Figura 22.</b> Expressão do receptor TRPA1 em células neuronais e microgliais após a exposição aos A $\beta$ Os.....	149
<b>Figura 23.</b> Análise da imunoreatividade para o receptor TRPA1 em cultura de células neuronais e microgliais após a exposição aos A $\beta$ Os.....	150
<b>Figura 24.</b> Efeito da exposição aos A $\beta$ Os sobre a expressão do receptor TRPA1 em cultura de células neuronais e microgliais.....	151
<b>Figura 25.</b> Influência de um inibidor de síntese proteica sobre a expressão do receptor TRPA1.....	153
<b>Figura 26.</b> Quantificação dos processos neuronais imunorreativos para o receptor TRPA1.....	154
<b>Figura 27.</b> A expressão do receptor TRPA1 em células microgliais expostas aos A $\beta$ Os <sub>40</sub> ou A $\beta$ Os <sub>42</sub> .....	156
<b>Figura 28.</b> A expressão do receptor TRPA1 em células microgliais e astrocitárias expostas A $\beta$ Os.....	157
<b>Figura 29.</b> Decurso temporal da expressão do receptor TRPA1 nos encéfalos de camundongos <i>Swiss</i> após a administração i.c.v. de A $\beta$ Os.....	159
<b>Figura 30.</b> Avaliação da expressão do receptor TRPA1 nos encéfalos de camundongos <i>Swiss</i> após a administração i.c.v. de A $\beta$ Os.....	160

<b>Figura 31.</b> Decurso temporal da imunodeteção para o receptor TRPA1 nos encéfalos de camundongos <i>Swiss</i> após a administração i.c.v. de A $\beta$ Os.....	162
<b>Figura 32.</b> Expressão do receptor TRPA1 em diferentes regiões encefálicas de camundongos transgênicos 5xFAD.....	164
<b>Figura 33.</b> Expressão do receptor TRPA1 no encéfalo de pacientes diagnosticados com a doença de Alzheimer.....	166
<b>Figura 34.</b> Avaliação da distribuição do receptor TRPA1 e dos A $\beta$ Os em encéfalos de camundongos transgênicos 5xFAD.....	169
<b>Figura 35.</b> Distribuição do receptor TRPA1 e dos A $\beta$ Os e a expressão de células microgliais na sub-região CA3 do hipocampo de camundongos transgênicos 5xFAD.....	172
<b>Figura 36.</b> Distribuição do receptor TRPA1 e dos A $\beta$ Os e a expressão de células microgliais no córtex de camundongos transgênicos 5xFAD.....	173
<b>Figura 37.</b> Distribuição do receptor TRPA1 e dos A $\beta$ Os e a expressão de células microgliais no córtex de camundongos transgênicos 5xFAD em plano único.....	174
<b>Figura 38.</b> Distinção entre os oligômeros e as placas de A $\beta$ em encéfalos de camundongos transgênicos 5xFAD.....	176
<b>Figura 39.</b> Distribuição de A $\beta$ Os no córtex e hipocampo de camundongos transgênicos 5xFAD.....	177
<b>Figura 40.</b> O envolvimento do receptor TRPA1 no déficit cognitivo induzido por A $\beta$ Os <sub>40</sub> em camundongos <i>Swiss</i> .....	180
<b>Figura 41.</b> A participação do receptor TRPA1 no déficit cognitivo induzido por A $\beta$ Os <sub>40</sub> em camundongos <i>Swiss</i> .....	182

<b>Figura 42.</b> Avaliação do déficit cognitivo induzido por A $\beta$ Os <sub>42</sub> em camundongos com deleção gênica para o receptor TRPA1.....	184
<b>Figura 43.</b> Comparação do déficit comportamental induzido por diferentes preparações de A $\beta$ Os e característico de animais transgênicos.....	187
<b>Figura 44.</b> O efeito do tratamento com o antagonista do receptor TRPA1 sobre o déficit cognitivo induzido por A $\beta$ Os <sub>40</sub> em camundongos <i>Swiss</i> .....	189
<b>Figura 45.</b> O efeito do tratamento com o antagonista do receptor TRPA1 sobre o déficit cognitivo induzido por A $\beta$ Os <sub>42</sub> em camundongos <i>Swiss</i> .....	190
<b>Figura 46.</b> O efeito do tratamento com o antagonista do receptor TRPA1 sobre o déficit cognitivo de camundongos transgênicos 5xFAD.....	192
<b>Figura 47.</b> O efeito do tratamento com o antagonista do receptor TRPA1 sobre o dano sináptico induzido por A $\beta$ Os <sub>40</sub> em camundongos <i>Swiss</i> .....	194
<b>Figura 48.</b> O efeito do tratamento com o antagonista do receptor TRPA1 sobre o dano sináptico induzido por A $\beta$ Os <sub>42</sub> em hipocampo de camundongos <i>Swiss</i> .....	197
<b>Figura 49.</b> O efeito do tratamento com HC030031 sobre o dano sináptico induzido por A $\beta$ Os <sub>42</sub> em hipocampo de camundongos <i>Swiss</i> .....	198
<b>Figura 50.</b> O tratamento com HC030031 exerce efeito benéfico sobre o dano sináptico induzido por A $\beta$ Os <sub>42</sub> .....	199
<b>Figura 51.</b> O efeito do tratamento com o antagonista do receptor TRPA1 sobre os A $\beta$ Os <sub>42</sub> e as placas de A $\beta$ no encéfalo de camundongos transgênicos 5xFAD.....	201
<b>Figura 52.</b> O efeito do tratamento com antagonistas do receptor TRPA1 sobre a expressão de marcadores pró- e anti-inflamatórios em células microgliais.....	204
<b>Figura 53.</b> Desenho esquemático do papel do receptor TRPA1 na toxicidade induzida por A $\beta$ Os.....	235

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sumário dos resultados relacionados à expressão do receptor TRPA1 no encéfalo.....	125
<b>Tabela 2.</b> Sumário dos resultados relacionados à toxicidade neuronal induzida por A $\beta$ Os.....	134
<b>Tabela 3.</b> Sumário dos resultados relacionados à ligação dos A $\beta$ Os ao receptor TRPA1.....	147
<b>Tabela 4.</b> Sumário dos resultados relacionados ao acúmulo de A $\beta$ Os e a distribuição do receptor TRPA1.....	178
<b>Tabela 5.</b> Sumário dos resultados da participação do receptor TRPA1 no déficit cognitivo induzido por A $\beta$ Os.....	185
<b>Tabela 6.</b> Sumário dos resultados sobre os efeitos benéficos do antagonismo do receptor TRPA1 em modelos experimentais relacionados à DA.....	205
<b>Tabela 7.</b> Revisão dos receptores que já foram propostos como alvo para os A $\beta$ Os.....	219





## LISTA DE ABREVIATURAS

**$\alpha 7$  nAChR** – receptor  $\alpha 7$  nicotínico para a acetilcolina (do inglês;  *$\alpha 7$  nicotinic Acetylcholine Receptor*)

**A $\beta$**  – peptídeo beta amilóide (do inglês; amyloid beta peptide)

**A $\beta$ Os** – oligômeros do peptídeo beta amilóide

**A $\beta$ Os<sub>40</sub>** – oligômeros do peptídeo beta amilóide fração 1-40

**A $\beta$ Os<sub>42</sub>** – oligômeros do peptídeo beta amilóide fração 1-42

**AMPA** – alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

**ANI** – anisomicina

**AP-18** – 4-(4-Clorofenil)-3-metilbut-3-en-2-oxima; antagonista seletivo do receptor TRPA1

**APP** – proteína precursora amilóide (do inglês; Amyloid Precursor Protein)

**AU** – acetato de uranila

**BDNF** – fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês; Brain Derived Neurotrophic Factor)

**BSA** – soro albumina bovina (do inglês; Bovine Serum Albumin)

**CB<sub>2</sub>** – receptor canabinóide do tipo 2

**CNH** – cinamaldeído (do inglês; *cinnamaldehyde*)

**COX-2** – Ciclooxigenase- 2

**CTL** – controle

**D $\beta$ M** – n-dodecil- $\beta$ -d-maltósido (do inglês; n-dodecyl- $\beta$ -d-maltoside)

**DA** – doença de Alzheimer

**DAPI** – 4',6-diamidino-2-fenilindol

**DIV** – dias *in vitro*

**DMEM** – meio eagle modificado por Dulbecco (do inglês; Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

**DMSO** – dimetilsulfóxido

**EDTA** – ácido etilenodiaminotetra-acético (do inglês; Ethylenediamine tetraacetic acid)

**EphB2** – receptor de tirosina quinase EphB2 (do inglês; *Ephrin type-B receptor 2*)

**E.P.M.** – erro padrão da média

**EROS** – espécies reativas de oxigênio

**F** – objeto familiar

**FAM** – amidita de fluoresceína (do inglês; Fluorescein Amidite)

**FCCP** – carbonil cianeto de p-trifluormetoxifenilhidrazona (do inglês; carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazine)

**FH** – formação hipocampal

**FITC** – isotiocianato de fluoresceína (do inglês; Fluorescein Isothiocyanate)

**FPR2** – receptor de peptídeos formil do tipo 2 (do inglês; *Formyl peptide receptor 2*)

**GD** – giro dentado

**GFAP** – proteína ácida fibrilar (do inglês; Glial Fibrillary Acidic Protein)

**GPCRs** – receptores acoplados a proteína G (do inglês; G Protein-Coupled Receptors)

**H<sub>2</sub>DCFH-DA** – 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (do inglês; 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate)

**HBSS** – solução de sais balanceada de Hank (do inglês; Hank's Balanced Salt Solution)

**HC030031** – 2-(1,3-dimetil-2,6-dioxi-1,2,3,6-tetraidropurina-7-il)-N-[4-(propa-2-il]fenil) acetamida; antagonista seletivo do receptor TRPA1

**HFIP** – 1,1,1,3,3,3- hexafluoro-2-propanol

**Iba-1** – molécula adaptadora da ligação de cálcio ionizado 1 (do inglês; Ionized calcium Binding Adaptor molecule 1)

**i.c.v.** – intracerebroventricular

**IKK-2** – quinase inibidora do fator nuclear kappa-B (do inglês; Inhibitor of nuclear factor Kappa-B Kinase)

**IL-10** – interleucina 10

**iNOS** – óxido nítrico sintase induzida (do inglês; inducible Nitric Oxide Synthase)

**i.p.** – intraperitoneal

**JC-1** – tetracloro tetratilbenzimidazol iodeto de carbocianina (do inglês; 5,5',6,6'tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide)

**kDa** – quilodalton

**KO** – animais *knockout*; apresentam deleção gênica

**LilrB2** – receptores de imunoglobulinas subfamília B membro 2 (do inglês; *Leukocyte Immunoglobulin-like receptor subfamily B member 2*)

**LTP** – potenciação de longo prazo (do inglês; Long Term Potentiation)

**MET** – microscopia eletrônica de transmissão

**mGluR5** – receptor metabotrópico para o glutamato subtipo 5 (do inglês; *metabotropic Glutamate Receptor subtype 5*)

**MSP** – proteínas de suporte de membranas (do inglês; Membrane Scaffold Proteins)

**N** – objeto novo

**NaCl** – cloreto de sódio

**ND** – não-demente

**NF-kB** – fator nuclear kappa B (do inglês; Nuclear Factor Kappa B)

**NGS** – soro normal de cabra (do inglês; Normal Goat Serum)

**NMDA** – N-metil-(D)-aspartato

**nNOS** – óxido nítrico sintase neuronal (do inglês; neuronal Nitric Oxide Synthase)

**NO** – óxido nítrico (do inglês; Nitric Oxide)

**p75 NTR** – receptor P75 para neurotrofinas (do inglês; *p75 neurotrophin receptor*)

**PBS** – tampão fosfato (do inglês; Phosphate Buffered Solution)

**PI** – iodeto de propídeo (do inglês; Propidium Iodide)

**PMM** – potencial de membrana mitocondrial

**POPC** – palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (do inglês; palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine)

**PrPC** – proteína prion celular

**PS1** – presinilina 1

**PSD95** – domínio pós-sináptico 95 kDa (do inglês; Post Synaptic Domain 95 kDa)

**PSEN1** – gene codificador da presinilina 1

**RAGE** – receptor para produtos finais de glicação avançada (do inglês; *Receptor for Advanced Glycation Endproducts*)

**RAMPs** – proteínas modificadores da atividade dos receptores para amilina (do inglês; *Receptor Activity Modifying Proteins for amylin*)

**REL** – retículo endoplasmático liso

**RIPA** – tampão de precipitação para radioimunoensaio (do inglês; Radio Immuno Precipitation Assay buffer)

**RO** – reconhecimento de objetos

**r.p.m.** – rotações por minuto

**SDS** – dodecil sulfato de sódio (do inglês; Sodium Dodecyl Sulfate)

**SMPL** – biblioteca de proteínas de membrana solubilizadas (do inglês; Solubilized Membrane Protein Library)

**SNC** – sistema nervoso central

**SPF** – livre de patógenos (do inglês; Specific-pathogen-free)

**TBS** – solução salina tamponada com Tris (do inglês; Tris-buffered Saline)

**TBS-T** – solução salina tamponada com Tris acrescida de Tween 80 0,5 % (do inglês; Tris-buffered Saline Tween)

**TG** – transgênico

**Thio-S** – tioflavina-S (do inglês; Thioflavin-S)

**VEIC** – veículo

**v.o.** – via oral

**WT** – *wild-type*



# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>1.1 Doença de Alzheimer.....</b>	<b>39</b>
1.1.1 <i>Tratamento x Diagnóstico.....</i>	<i>40</i>
1.1.2 <i>Características Fisiopatológicas da DA.....</i>	<i>42</i>
1.1.3 <i>A Memória e as Sinapses.....</i>	<i>47</i>
1.1.4 <i>Modelos animais experimentais para estudar a DA.....</i>	<i>49</i>
<b>1.2 O Receptor de Potencial Transitório Anquirina do tipo 1 - TRPA1.....</b>	<b>51</b>
1.2.1 <i>Agonistas x Antagonistas do receptor TRPA1.....</i>	<i>56</i>
1.2.2 <i>Os TRPs e a doença de Alzheimer.....</i>	<i>59</i>
<b>1.3 Hipótese.....</b>	<b>60</b>
<b>1.4 Justificativa.....</b>	<b>60</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>63</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>63</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>63</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
<b>3.1 Considerações éticas e experimentais.....</b>	<b>65</b>
3.1.1 <i>Considerações éticas.....</i>	<i>65</i>
3.1.2 <i>Considerações experimentais.....</i>	<i>65</i>
<b>3.2 Animais.....</b>	<b>66</b>
3.2.1 <i>Camundongos Swiss.....</i>	<i>66</i>
3.2.2 <i>Camundongos transgênicos 5xFAD.....</i>	<i>67</i>
3.2.3 <i>Camundongos TRPA1 KO.....</i>	<i>68</i>
3.2.4 <i>Ratos Wistar e Sprague-Dawley.....</i>	<i>68</i>
<b>3.3 Cultura primária de células.....</b>	<b>69</b>
3.3.1 <i>Cultura primária de neurônios hipocampais...69</i>	
3.3.2 <i>Cultura primária de astroglias corticais.....</i>	<i>71</i>

3.3.2.1 Cultura primária de microglias corticais.....	73
3.3.2.2 Cultura primária de astrócitos corticais.....	73
3.3.3 <i>Cocultura de neurônios hipocampais e astroglias corticais</i> .....	74
<b>3.4 Tecido encefálico de humanos</b> .....	75
<b>3.5 Oligomerização dos peptídeos A<math>\beta</math></b> .....	76
3.5.1 <i>Preparação e caracterização dos A<math>\beta</math>Os fração 1-40 (A<math>\beta</math>Os40)</i> .....	76
3.5.2 <i>Preparação e caracterização dos A<math>\beta</math>Os fração 1-42 (A<math>\beta</math>Os42) e A<math>\beta</math>Os42 fluorescentes (FAM-A<math>\beta</math>Os42)</i> .....	77
<b>3.6 Injeção intracerebroventricular dos A<math>\beta</math>Os</b> .....	79
<b>3.7 Antagonistas e agonista do receptor TRPA1</b> .....	80
<b>3.8 Testes comportamentais in vivo</b> .....	80
3.8.1 <i>Reconhecimento de Objetos (RO)</i> .....	80
3.8.2 <i>Teste de esquivas passiva “step down”</i> .....	83
<b>3.9 Testes de toxicidade in vitro</b> .....	84
3.9.1 <i>Determinação do potencial de membrana mitocondrial</i> .....	84
3.9.2 <i>Avaliação da formação de EROS</i> .....	85
3.9.3 <i>Incorporação de iodeto de propídeo</i> .....	87
<b>3.10 Imunocitoquímica</b> .....	88
3.10.1 <i>Análise da expressão do TRPA1 em culturas primárias de células</i> .....	90
3.10.2 <i>Avaliação da ligação dos A<math>\beta</math>Os aos dendritos neuronais</i> .....	91
3.10.3 <i>Efeito do HC030031 sobre a ligação dos A<math>\beta</math>Os em dendritos neuronais</i> .....	92
<b>3.11 Coleta do material biológico para as análises moleculares e bioquímicas</b> .....	92
<b>3.12 Análises moleculares e bioquímicas ex vivo</b> .....	94
3.12.1 <i>Imunofluorescência</i> .....	94
3.12.1.1 <i>Avaliação da expressão de TRPA1</i> .....	95
3.12.1.2 <i>Dupla marcação para TRPA1 e A<math>\beta</math>Os</i> .....	95



3.12.1.3 Tripla marcação para TRPA1, A $\beta$ Os e microglia.....	96
3.12.1.4 Detecção de A $\beta$ Os seguida de contracoloração por Tioflavina-S.....	96
3.12.2 <i>Imunoistoquímica</i> .....	97
3.12.3 <i>Western Blotting</i> .....	99
3.12.3.1 Determinação dos oligômeros de A $\beta$ Os <sub>42</sub> .....	99
3.12.3.2 Preparo do extrato celular total de células primárias e determinação de proteínas.....	100
3.12.3.3 Preparo do extrato celular total do tecido encefálico de camundongos e determinação de proteínas.....	101
3.12.3.4 Preparo do extrato celular total de tecido encefálico de humanos e determinação de proteínas.....	103
3.12.3.5 Imunodeteccção de proteínas por <i>Western blotting</i> .....	103
3.12.4 <i>Sinaptossomas de córtex de ratos</i> .....	105
3.12.4.1 Preparação dos sinaptossomas.....	106
3.12.5 <i>Coimunoprecipitação de proteínas</i> .....	107
3.12.6 <i>Ensaio de ligação de A<math>\beta</math>Os por alpha screening</i> .....	108
3.12.6.1 Preparação dos nanodiscos.....	109
3.12.6.2 Efeito do HC030031 sobre a ligação dos A $\beta$ Os por ensaio de <i>alpha screening</i> .....	111
3.12.7 <i>Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</i> .....	113
3.12.7.1 Preparo das amostras.....	114
3.12.7.2 Análise de terminações sinápticas por MET.....	115
<b>3.13 Análise estatística</b> .....	116
<b>4. RESULTADOS</b> .....	119

<b>4.1 Avaliação da expressão do receptor TRPA1 no encéfalo.....</b>	<b>119</b>
<b>4.2 A participação do receptor TRPA1 na toxicidade induzida por AβOs.....</b>	<b>126</b>
<b>4.3 O envolvimento do receptor TRPA1 na ligação dos AβOs às sinapses.....</b>	<b>135</b>
<b>4.4 O impacto do acúmulo de AβOs sobre a expressão do receptor TRPA1.....</b>	<b>148</b>
<i>4.4.1 A relação entre a distribuição e o acúmulo de TRPA1 e dos AβOs.....</i>	<i>167</i>
<b>4.5 A importância do receptor TRPA1 para o déficit cognitivo induzido por AβOs.....</b>	<b>179</b>
<b>4.6 Determinação do efeito benéfico do tratamento com HC030031, um antagonista TRPA1.....</b>	<b>186</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>207</b>
<b>6. SUMÁRIO DE RESULTADOS.....</b>	<b>237</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>239</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>239</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>241</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>275</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>277</b>

# 1.INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa que acomete principalmente idosos e é caracterizada pelo declínio progressivo e irreversível das funções cognitivas (SELKOE, 2011). Os tratamentos atualmente empregados não são capazes de curar ou impedir a progressão da doença. Entretanto, recursos terapêuticos limitados são empregados para diminuir temporariamente o agravamento dos sintomas e, deste modo, tentar melhorar a qualidade de vida do paciente (SELKOE, 2013). A idade é o principal fator de risco para a doença, sendo que a partir dos 65 anos o risco dobra a cada 5 anos de vida (MOUNT; DOWNTON, 2006).

Nos EUA, a doença de Alzheimer ocupa o sexto lugar no ranking das doenças que levam à morte, com mais de 5 milhões de indivíduos portadores da doença, sendo a única, entre as dez causas de mortalidade, que não pode ser prevenida, curada ou mesmo diagnosticada em vida (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2015). No Brasil, não existem dados precisos sobre o número de pessoas afetadas pela doença. Segundo os dados do último censo demográfico do ano de 2010, o número de indivíduos com 65 anos de idade ou mais era de aproximadamente 11,5 milhões (IBGE, 2010), evidenciando o impacto das projeções da doença para a população idosa. A expectativa de vida da população aumenta a cada ano, e um em cada quatro idosos desenvolve a doença. Segundo dados recentes da Associação Internacional da Doença de Alzheimer, a cada 67 segundos um americano é acometido pela doença, reafirmando a alta incidência da doença e a

necessidade de busca de novas terapias, bem como possíveis diagnósticos em fases iniciais.

### *1.1.1 Tratamento x Diagnóstico*

A DA é a uma doença de extrema importância – visto que o envelhecimento populacional é um fato real – e que demanda cuidados especiais para os pacientes, gerando muitos gastos para as famílias dos portadores da doença, e para a sociedade de modo geral. É discrepante a diferença entre os investimentos realizados em pesquisa sobre a DA e o impacto econômico e social causado pela doença. Somente nos EUA são gastos anualmente 214 bilhões de dólares com o tratamento de pessoas diagnosticadas pelo clínico com a DA, enquanto que os investimentos em pesquisas que contribuam ao entendimento da doença, bem como o progresso no desenvolvimento de um tratamento e/ou um diagnóstico eficaz, permanecem extremamente limitados (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2015).

Apesar de todos os avanços obtidos nos últimos anos, tanto na pesquisa, quanto na clínica, não há ainda fármacos eficazes para o tratamento da DA. Atualmente, somente duas classes de fármacos são utilizadas e aprovadas para o tratamento da DA: os (1) inibidores da enzima acetilcolinesterase, e os (2) bloqueadores do receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA) (HOLTZMAN; MANDELKOW; SELKOE, 2012; SELKOE, 2013). Os fármacos inibidores da enzima acetilcolinesterase, como a Rivastigmina e o Donepezil, são utilizados na tentativa de reestabelecer os níveis de ativação de neurônios colinérgicos, pelo bloqueio da enzima que degrada o neurotransmissor acetilcolina. Os neurônios colinérgicos são afetados negativamente durante a progressão da DA

levando a morte destas fibras (DAVIES; MALONEY, 1976; FERREIRA-VIEIRA *et al.*, 2016; PERRY *et al.*, 1978). Outro sistema que é comprometido durante a progressão da DA é o sistema glutamatérgico. Diferente do que acontece com o sistema colinérgico, ocorre a modulação positiva deste sistema, ou seja, intensa ativação das fibras glutamatérgicas, durante a progressão da doença. Desta maneira, torna-se compreensível o uso da segunda classe de fármacos utilizados para o tratamento da DA, os bloqueadores do receptor NMDA – ativado por glutamato – sendo o único fármaco desta classe a Memantina (FRANCIS, 2003; HAN; MOOK-JUNG, 2014; INGRAM *et al.*, 1994).

A escassez de métodos diagnósticos eficazes para a DA, ainda em vida e em fases iniciais da doença, é outro fator significativo que pode contribuir para a ineficácia dos tratamentos atuais utilizados. Um dos diagnósticos alternativos recentes e mais promissores é a detecção ou monitoramento da doença através de técnicas de análise de imagens do cérebro de pacientes, como a sonda para PET scan (do inglês, *Positron Electron Transmission*), que detecta placas amilóides (COHEN *et al.*, 2012; KLUNK *et al.*, 2004). As placas amilóides são utilizadas como alvos para marcadores diagnósticos da DA *post mortem* e são formadas por agregados do peptídeo beta-amiloide (A $\beta$ ), uma das características fisiopatológicas da DA. A introdução desta nova técnica diagnóstica, possível de ser realizada em pacientes vivos, pode representar um grande avanço tecnológico e estabelece um novo precedente para análise molecular por imagem do cérebro, contribuindo ao desenvolvimento de ferramentas mais avançadas de diagnóstico e possivelmente no desenvolvimento de novos fármacos (JOHNSON *et al.*, 2013). No entanto, sabe-se que a presença de placas amiloides tem pouca correlação com

o déficit cognitivo e a demência que são observados durante a progressão da doença (TERRY *et al.*, 1991). Para complicar ainda mais o quadro, as placas não estão presentes nos estágios iniciais da doença (NYBORG *et al.*, 2013). Neste sentido, sondas para marcadores alternativos, especialmente aqueles que parecem estar presentes desde o início da DA, seriam uma ferramenta de intervenção eficaz na progressão da doença, como por exemplo, utilizando sondas que identificam a presença de oligômeros do peptídeo  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ Os) solúveis, presentes nas fases iniciais da doença (VIOLA *et al.*, 2015).

### *1.1.2 Características Fisiopatológicas da DA*

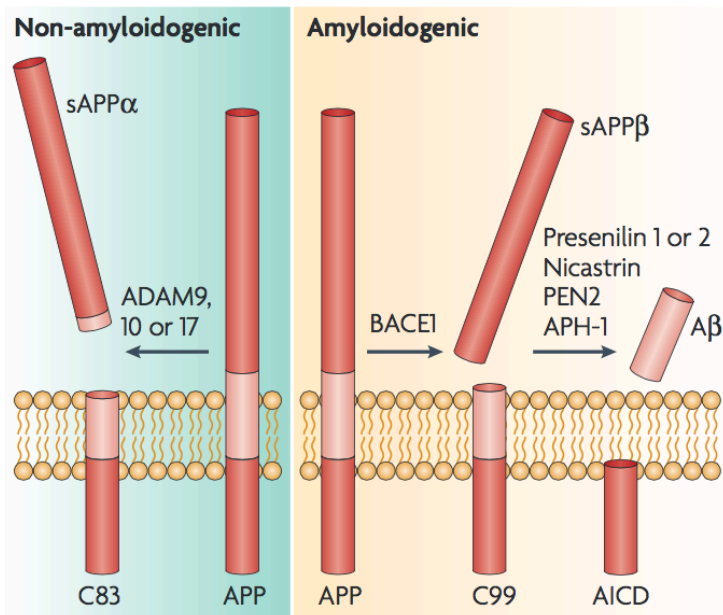
Os oligômeros solúveis do peptídeo  $\beta$ -amilóide, em vez das placas amilóides, são os responsáveis pela falhas e perdas sinápticas observadas na DA, e as estruturas que melhor se correlacionam com a perda da memória, o sintoma característico da doença (KLEIN; KRAFFT; FINCH, 2001; LUBLIN; GANDY, 2010; SCHNABEL, 2011). A “Hipótese dos Oligômeros de A $\beta$  - A $\beta$ Os” é relativamente nova, e não subjuga completamente a teoria antiga, a “Hipótese da Cascata Amilóide”, que durante muitos anos foi o tema da maioria dos estudos relacionados à doença (FERREIRA; KLEIN, 2011). A Hipótese da Cascata Amilóide surgiu no final da década de 1980 e foi formulada por dois grupos independentes de pesquisa (ALLSOP *et al.*, 1988; SELKOE, 1989). Mediante um trabalho de revisão, Hardy e Higgins no ano de 1992 apresentaram formalmente a hipótese. Segundo eles, a demência observada na DA estaria relacionada à morte neuronal causada pelas placas amilóides fibrilares e insolúveis (HARDY;

HIGGINS, 1992). Sabe-se atualmente que a DA está mais relacionada à agregação do peptídeo A $\beta$ , e que as fibrilas (formadoras das placas amilóides) insolúveis não são as únicas toxinas formadas durante o processo de agregação. As placas, muito provavelmente, não são as toxinas mais relevantes para a toxicidade observada na doença e caracterizada em modelos experimentais. As formas solúveis de A $\beta$  (monômeros, oligômeros de baixo e de alto peso molecular e protofibrilas) parecem estar mais associadas às características patológicas observadas durante a progressão da doença, como por exemplo, o prejuízo da plasticidade sináptica e a neurodegeneração (FERREIRA *et al.*, 2015; KUO *et al.*, 1996; SHANKAR *et al.*, 2008).

A DA é caracterizada pelo acúmulo de duas diferentes proteínas: o peptídeo A $\beta$  – (denominado anteriormente de proteína) e a proteína Tau. O peptídeo A $\beta$ , composto essencialmente por 40 ou 42 aminoácidos, sofre diferentes estágios de agregação - o último estágio de agregação resulta na formação de fibrilas que formam as placas amiloides e se depositam no espaço extracelular (GLENNER *et al.*, 1984). A proteína Tau está naturalmente associada aos microtúbulos axonais e durante a progressão da doença sofre fosforilação anormal, finalmente agregando-se em emaranhados neurofibrilares, que são intracelulares (GRUNDKE-IQBAL *et al.*, 1986). Ambas as proteínas alteradas são encontradas principalmente nas regiões corticais e hipocampus do encéfalo de pacientes portadores da DA (BRAAK; BRAAK, 1998; DICKSON, 1997). O peptídeo A $\beta$  parece ter um papel central na DA, sendo o maior componente das placas amilóides (WYSS-CORAY, 2006). Ele é gerado pela clivagem da proteína precursora amilóide (APP; do inglês, *Amyloid Precursor Protein*), uma proteína transmembrana que em situações

fisiológicas (ou via não-amiloidogênica) sofre duas clivagens enzimáticas, primeiramente pela enzima  $\alpha$ -secretase, seguido de clivagem pela  $\gamma$ -secretase, gerando um fragmento p3 atóxico. Na via amiloidogênica, não fisiológica, a APP é inicialmente clivada por uma protease aspártica, denominada  $\beta$ -secretase ou BACE (do inglês, *Beta-site APP Cleaving Enzyme*), gerando proteínas precursoras  $\beta$ -amilóides solúveis (sAPP $\beta$ ; do inglês, *soluble Amyloid Precursor Protein  $\beta$* ) e resíduos de  $\beta$ -fragmento C-terminal (CTF $\beta$ ; do inglês, *C-terminal Fragment  $\beta$* ). O CTF $\beta$  é então clivado pela  $\gamma$ -secretase que produz CTF $\gamma$  e fragmentos ou peptídeos A $\beta$  (HAASS, 2004; LAFERLA; GREEN; ODDO, 2007; SELKOE, 2011). Um desenho esquemático é apresentado na Figura 1.





**Figura 1. Processo proteolítico da APP.** A Proteína precursora amilóide (APP) contém 695–770 aminoácidos e sofre dois processos proteolíticos: um não-amiloidogênico e outro amiloidogênico. O processo não-amiloidogênico é mediado por  $\alpha$ -secretase, ou enzimas ADAM: ADAM9, ADAM10 e ADAM17. O processo amiloidogênico é mediado por  $\beta$ -secretase (BACE1), seguido de clivagem por  $\gamma$ -secretase que é realizado, principalmente pelos complexos Presenilina 1 ou 2 desta enzima. A clivagem produz predominantemente os fragmentos A $\beta$ 1–40, e ainda em menor grau os fragmentos A $\beta$ 1–42, que são mais tóxicos. Retirado de LAFERLA; GREEN; ODDO, 2007.

Os agregados do peptídeo A $\beta$  são uma das principais características neuropatológicas identificadas na DA, porém não é este fenômeno isoladamente que afeta as funções neurológicas dos portadores da doença, e sim os eventos celulares, os mecanismos patológicos e

a indução de toxicidade que estes peptídeos são capazes de estimular. De fato, é estreita a relação entre a proteína Tau e o peptídeo A $\beta$ , e ambos parecem contribuir para a toxicidade neuronal (ITTNER; GÖTZ, 2011). Durante o processo de acúmulo destes peptídeos, principalmente do peptídeo A $\beta$  (mais estudado e caracterizado), diversos mecanismos moleculares são ativados ou inibidos. Assim, a compreensão integral da progressão da DA e do consequente processo de neurodegeneração a ela associado é bastante complexo. Dentre todos os eventos heterogêneos associados à DA, há, em especial, dois muito bem descritos: o estresse oxidativo e o processo inflamatório. O estresse oxidativo compreende uma série de alterações como, por exemplo, a disfunção mitocondrial, a ativação de receptores NMDA, a excitotoxicidade induzida por Ca<sup>2+</sup> e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS)(SATTLER; TYMIANSKI, 2000; SULTANA; BUTTERFIELD, 2009). No processo inflamatório observado na DA, estão presentes a ativação de enzimas pró-inflamatórias, a indução da expressão de proteínas inflamatórias, a produção e liberação de citocinas, a ativação e a migração das células da glia (principalmente a microglia), além de outros fatores (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016; MCGEER; MCGEER, 2002; MORALES *et al.*, 2014). É muito provável que ambos os processos, em geral descritos isoladamente para facilitar a compreensão de cada um deles na progressão da doença, ocorram de maneira concomitante e cooperativa. Análises de encéfalos de humanos e animais em processo de envelhecimento mostraram um aumento da regulação de genes, que estavam de fato relacionados ao avanço da idade, e que, a metade destes genes estavam envolvidos no processo de estresse oxidativo e inflamação (BISHOP; LU;

YANKNER, 2010; LOERCH *et al.*, 2008). Níveis elevados de TNF- $\alpha$  – uma importante citocina pró-inflamatória – foram encontrados no plasma de pacientes portadores da DA (FILLIT *et al.*, 1991). Ademais, a presença exacerbada de microglias ativadas circundando as placas fibrilares de A $\beta$  (HAGA; AKAI; ISHII, 1989). Há mais de duas décadas foi proposto que o dano causado aos neurônios não é resultado apenas da deposição de A $\beta$  ou Tau, mas que o processo inflamatório e o processo oxidativo são fatores determinantes que contribuem para a progressão deste dano (MCGEER *et al.*, 1989).

### 1.1.3 A Memória e as Sinapses

A doença de Alzheimer tem como sintoma principal a perda da memória. O que ocorre inicialmente é o prejuízo do aprendizado e da memória de curto prazo, sem alteração em outras funções cognitivas. Em seguida, são observadas mudanças na memória de longo prazo e na orientação das funções executivas, por exemplo, na concentração e planejamento. Isto ocorre principalmente porque as primeiras áreas afetadas na DA são o córtex entorrinal e o hipocampo, áreas reconhecidas pelo processamento e armazenamento da memória (FJELL *et al.*, 2014; MATTSON, 2004; WALSH; SELKOE, 2004). Há evidências de que a doença se instala inicialmente no córtex entorrinal, e com o acúmulo de A $\beta$ , se difunde, mais tarde, para o hipocampo via pré- e para-subiculum, provocando a fosforilação anômala da proteína Tau (WISNIEWSKI *et al.*, 1998). Anatomicamente, o hipocampo conecta-se com o subiculum, pré-subiculum e para-subiculum, através de projeções neuronais excitatórias que são enviadas da

subregião CA1 (FANSELOW; DONG, 2010). As espinhas dendríticas são os sítios primários para as sinapses excitatórias dos neurônios principais da circuitaria da memória. Alterações em longo prazo na atividade sináptica incluem alterações no formato, tamanho e número de sinapses. As espinhas dendríticas finas (*thin*) são altamente responsivas ao aumento e diminuição da atividade sináptica, sendo sugeridas como "espinhas do aprendizado", enquanto que as espinhas dendríticas com formato de cogumelo (*mushroom*) são mais estáveis, sendo indicadas como "espinhas da memória" (BOURNE; HARRIS, 2007). Na teoria da memória e da plasticidade sináptica observa-se que, para ocorrer a formação da memória é necessária atividade de sinapses específicas, de intensidade e tempo suficientes para a codificação que leva ao armazenamento do evento, e que é mediada, por exemplo, no hipocampo (TAKEUCHI; DUSZKIEWICZ; MORRIS, 2014). O hipocampo conecta-se, ainda, com o córtex cingulado e o retrosplenial, que são duas regiões corticais envolvidas no processamento cognitivo da informação visuo-espacial, no processamento da memória e na exploração ambiental (FANSELOW; DONG, 2010). Estas informações anatômicas e funcionais permitem entender com mais clareza os sintomas relacionados à DA. Em sua grande maioria, as doenças neurodegenerativas são incuráveis e a sua progressão não pode ser impedida. Naturalmente, isto ocorre também na DA. Em estágios mais tardios, com a intensa progressão da doença, é observada, além do prejuízo das funções cognitivas, a deterioração da linguagem e das habilidades visuo-espaciais, e o declínio da função motora (TERI *et al.*, 1989; WALSH; SELKOE, 2004).

#### 1.1.4 Modelos animais experimentais para estudar a DA

A DA pode ser estudada através do uso de modelos animais experimentais, principalmente em roedores. Os diversos grupos de pesquisa em DA fazem uso de diferentes ferramentas, as mais comuns, farmacológicas e genéticas, para estudar esta doença. É possível utilizar animais com idade avançada ( $\geq 14$  meses), que apresentam prejuízos sensoriais e cognitivos semelhantes aos observados nos indivíduos portadores da DA, durante a progressão da doença. Entretanto, animais envelhecidos não desenvolvem nenhum dos marcadores fisiopatológicos da doença, ou seja, não apresentam acúmulo de A $\beta$  ou emaranhados neurofibrilares de Tau (VAN DAM; DE DEYN, 2006; WALLACE; KRAUTER; CAMPBELL, 1980). Há também os modelos induzidos, dentre eles o que utiliza o peptídeo A $\beta$  tanto da fração 1-40 quanto da fração 1-42, que pode ser administrado de maneira aguda ou em infusões repetidas (FIGUEIREDO *et al.*, 2013; NAKAMURA *et al.*, 2001; PREDIGER *et al.*, 2007; TAKEDA *et al.*, 2009). A administração aguda, uma única injeção, não induz a formação de placas amiloides, porém mimetiza alguns aspectos importantes da fase inicial da DA, tornando-se um modelo experimental útil para a caracterização da neurotoxicidade e da neuroinflamação induzida pelo peptídeo (PASSOS *et al.*, 2009; TAKEDA *et al.*, 2009). Recentemente foi descrito um modelo de infusão do peptídeo A $\beta$  em primatas. Neste modelo, a fosforilação da proteína Tau, bem como a perda sináptica, são decorrentes da infusão dos oligômeros de A $\beta$  (A $\beta$ Os), porém não há formação de placas fibrilares de A $\beta$  (FORNY-GERMANO *et al.*, 2014). Ainda, dentre os modelos que utilizam toxinas para indução da toxicidade, há, por exemplo, os que usam

escopolamina e estreptozotocina (LANNERT; HOYER, 1998; SHARMA; GUPTA, 2001; VAN DAM; DE DEYN, 2006). Considerando todos os modelos experimentais induzidos, incluindo suas características, e os artigos científicos publicados, pode-se inferir que os modelos que utilizam o peptídeo A $\beta$  são os que mais estão relacionados às características da DA, e mais amplamente difundidos.

Para entender os modelos animais que provém de manipulação genética é necessária uma breve familiarização com aspectos genéticos da DA. A doença apresenta um caráter heterogêneo, tendo sido descritas as formas familiar e esporádica. A forma familiar da doença (a qual é relacionada a mutações em genes) tem herança autossômica dominante, e o início dos sintomas clínicos geralmente ocorre antes dos 65 anos de idade, sendo considerada a forma mais rara (POIRIER, 2005). A proporção de casos de DA familiar varia muito, estimando-se que seja entre 10 % a 40 %, e não se pode excluir o fato de que, na totalidade, os casos de DA, incluindo também os esporádicos, podem apresentar um fator genético determinante (SELKOE, 2011). A predisposição à DA já foi relacionada à mutações e/ou polimorfismos em quatro principais genes. Aquele que constitui o fator mais prevalente de predisposição à doença, compreendendo 30 % do total de casos da DA, é a herança de um ou dois alelos  $\epsilon$ 4, da apolipoproteína E (ApoE) (SAUNDERS *et al.*, 1993; STRITTMATTER *et al.*, 1993). Adicionalmente, há mutações em dois genes que são determinantes para o aparecimento de doença, os codificadores para APP, os quais compreendem menos que 0,01% dos casos, e mutações nos genes associados às proteínas pertencentes aos complexos enzimáticos que clivam APP, e geram os fragmentos tóxicos amilóides, como a Presenilina 1 (PSEN1) e a Presenilina

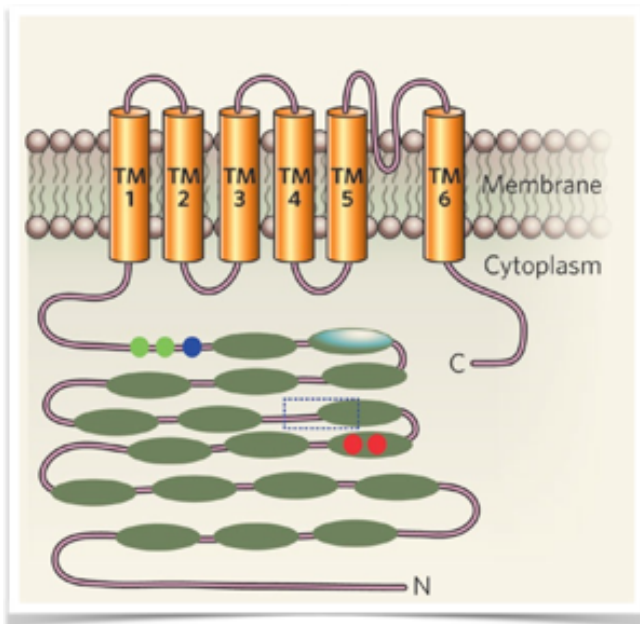
2 (PSEN2) (DORSZEWSKA *et al.*, 2016; PRICE; SISODIA, 1998; SCOTT *et al.*, 1996; SHERRINGTON *et al.*, 1995). Os camundongos transgênicos são úteis, por mimetizarem melhor a progressão da DA, tanto nos aspectos fisiopatológicos, quanto moleculares e comportamentais. Os diferentes animais transgênicos disponíveis podem apresentar uma ou mais características da doença, dependendo das manipulações genéticas obtidas, ou seja, das associações de genes que são realizadas nos animais. Há aqueles que superexpressam a APP, a presinilina ou ainda a proteína tau. Além disso, há os transgênicos que apresentam a associação de dois ou até dos três genes citados acima (para revisão, KITAZAWA; MEDEIROS; LAFERLA, 2012; VAN DAM; DE DEYN, 2006).

## **1.2 O Receptor de Potencial Transitório Anquirina do tipo 1 - TRPA1**

O Receptor de Potencial Transitório de Anquirina subtipo 1 (do inglês; *Transient Receptor Potential Ankyrin 1* – TRPA1), anteriormente denominado ANKTM1– devido ao grande número de repetições de Anquirina – é um canal catiônico não-seletivo para íons monovalentes ou bivalentes, que permite então a passagem de íons como o sódio ( $\text{Na}^+$ ) e, principalmente, o cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Fig. 2) (CATERINA, 2007a). Este receptor foi clonado pela primeira vez a partir do uso de uma linhagem de fibroblastos (JAQUEMAR; SCHENKER; TRUEB, 1999), e faz parte da grande família dos receptores de potencial transitório (TRPs), que estão distribuídos e localizados, principalmente, em fibras sensoriais associadas à resposta dolorosa (JIANG; GAMPER; BEECH, 2011; VENKATACHALAM; MONTELL, 2007). De fato, a grande

maioria dos estudos que envolve o receptor TRPA1 descreve a sua participação tanto em processos fisiológicos como patológicos, e versa, em geral, sobre o seu envolvimento no estresse oxidativo e/ou na inflamação, primariamente em processos dolorosos, detendo-se ao seu papel na medula espinhal (ANDRADE *et al.*, 2011; CATERINA, 2007b; DA COSTA *et al.*, 2010; KOSUGI *et al.*, 2007; MALSCH *et al.*, 2014; SUI *et al.*, 2010).



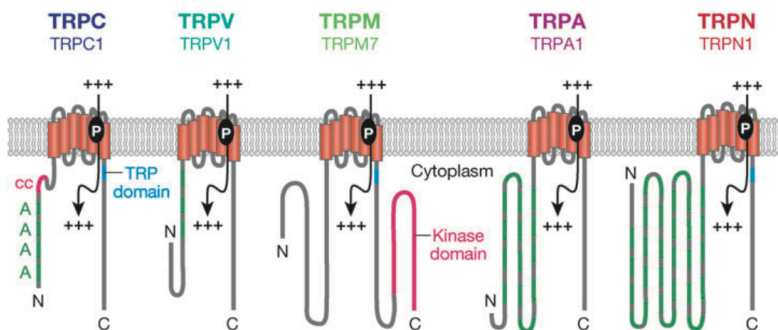


**Figura 2. Estrutura de uma subunidade formadora do receptor TRPA1.** Quatro subunidades idênticas formam o canal funcional. Como apresentado na figura cada subunidade apresenta 6 domínios transmembrana (TM1–TM6) e um longo amino (N)-terminal citoplasmático. As estruturas ovais verde escuras representam as repetições de Anquirina; Os círculos indicam os resíduos de cisteína que são cruciais para a ativação covalente do receptor em camundongos (vermelhos), humanos (verdes) e comuns as duas espécies (azul). (Retirado de CATERINA, 2007)

Os canais TRPs existem como homo- ou heterotetrâmeros e cada monômero (subunidade) destes tetrâmeros é constituído de seis domínios transmembrana, sendo que as terminações carboxi (C) e amino (N) terminais estão ambas dispostas no espaço intracelular. A união de quatro subunidades forma um poro de passagem para os cátions que se dispõe entre as alças 5 e 6 dos domínios transmembrana (MONTELL,

2005; VENKATACHALAM; MONTELL, 2007). Os TRPs foram primeiramente descobertos no gênero *Drosophila* e, posteriormente, por meio do estudo de cDNAs em bibliotecas de dados, foi revelada uma variedade de TRPs em mamíferos. Os mamíferos possuem 28 genes que codificam os TRPs, que são canais catiônicos não seletivos, em sua grande maioria permeáveis ao cálcio (JIANG; GAMPER; BEECH, 2011).

A maioria dos TRPs não apresenta sensibilidade exclusiva a um único fator. Ao contrário, os TRPs podem ser sensíveis a diferentes estímulos químicos, característica que contribui para o conceito de sensores químicos polimodais, podendo servir como integradores e moduladores de diferentes sinais pelo corpo (JIANG; GAMPER; BEECH, 2011). Os TRPs são classificados e subdivididos em famílias de acordo com a sequência de aminoácidos que compõe os seus N-terminais, e também de acordo com o seu perfil de ativação (Fig. 3). Dentre os clássicos, por exemplo, existem os Canônicos (TRPCs), os quais apresentam-se em 7 subtipos diferentes nos mamíferos; os de Melastatina (TRPMs), com 8 membros diferentes em mamíferos; os Vanilóides (TRPVs), que se distribuem em 6 subtipos e os de Ankirina (TRPA)(MONTELL, 2005). Em *C. elegans* apresenta foram descritos 2 subtipos de TRPA e em *Drosophila* 4 subtipos, e em mamíferos apenas um subtipo foi encontrado (Fig. 3), denominado TRPA1 (VENKATACHALAM; MONTELL, 2007), o objeto deste trabalho de tese.



	Worms	Flies	Mice	Humans
TRPC	3	3	7	6 <sup>1</sup>
TRPV	5	2	6	6
TRPM	4	1	8	8
TRPA	2	4	1	1
TRPN	1	1	0	0
TRPP <sup>2</sup>	1	1	3	3
TRPML	1	1	3	3
Total	17	13	28	27

**Figura 3. Classificação dos TRPs em famílias.** A estrutura dos TRPs clássicos e a composição das famílias de TRPs em vermes, moscas, camundongos e humanos. A= Anquirina; cc = domínio coiled-coil; P= poro para a passagem de íons. (Adaptado de VENKATACHALAM; MONTELL, 2007)

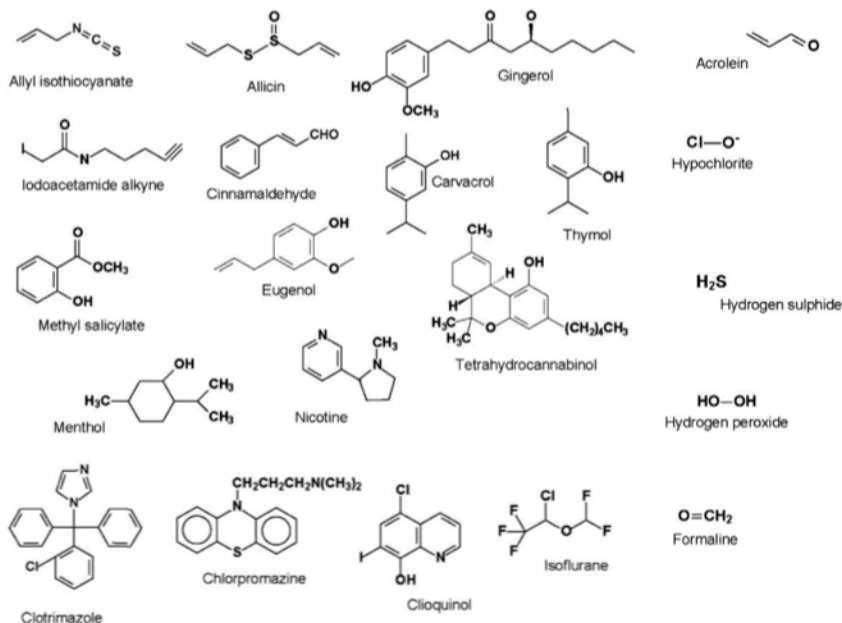
Embora existam diferenças quanto ao número de membros TRPA entre humanos e *Drosophila*, por exemplo, parece ser grande a conservação dos sinais entre as espécies. Um estudo sugere que a detecção de eletrófilos reativos, um mecanismo ativado por modificação covalente de TRPA1 nestas espécies – e que nos vertebrados é utilizado para promover pungência, irritação, inflamação e dor – apresenta um componente evolutivo conservado por mais de 500 milhões de anos (KANG *et al.*, 2010). Em contrapartida, outros autores ressaltam as diferenças existentes para o

TRPA1 entre as espécies, que podem interferir no estudos para o desenvolvimento de novos fármacos. Por exemplo, o fato de que o TRPA1 em *Drosophila* é ativado por calor e não por isotiocianato de alila, indica alguma divergência no processo evolutivo (VISWANATH *et al.*, 2003).

### 1.2.1 Agonistas x Antagonistas do receptor TRPA1

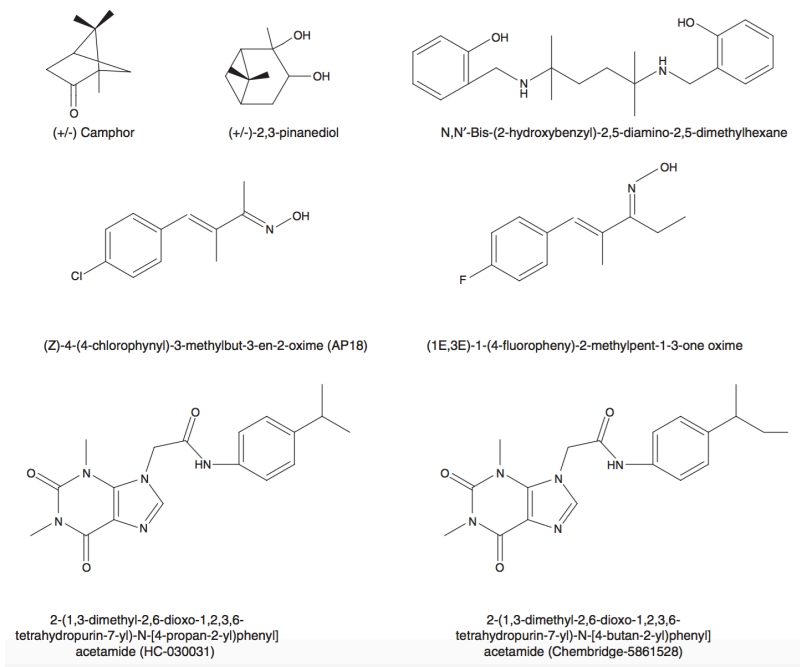
O principal mecanismo de ativação do TRPA1 se dá por modificações covalentes em resíduos de cisteína, os três principais, em camundongos Cis415, Cis422 e Cis622 e os seus homólogos, altamente conservados, em humanos Cis414, Cis421 e Cis621 (MACPHERSON *et al.*, 2007). As modificações nestes resíduos são induzidas pela ação de uma variedade de compostos exógenos (Fig. 4) e endógenos. Os compostos exógenos capazes de ativar o receptor são, em sua maioria, derivados de plantas e compostos químicos irritantes: o Isotiocianato de alila (derivado do óleo de mostarda), o Cinamaldeído (derivado da canela) (BANDELL *et al.*, 2004) e a Alicina (derivada do alho) (MACPHERSON *et al.*, 2005) que, em comum, ativam o TRPA1 via reação com os grupos sulfidríla nos resíduos de cisteína do receptor (BAUTISTA *et al.*, 2005). Ainda, como compostos exógenos, a Nicotina (presente no cigarro) (TALAVERA *et al.*, 2009) e o  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinol (THC) (JORDT *et al.*, 2004), entre muitos outros. Dentre os compostos endógenos que ativam o receptor podemos citar a PLC (fosfolipase C), ativada por sinais acoplados à proteína Gq, principalmente por ativação de receptores de Bradicinina (BANDELL *et al.*, 2004), e também as EROS, como o O<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o peroxinitrito (ANDERSSON *et al.*, 2008; SAWADA *et al.*, 2008; TAKAHASHI *et al.*,

2008). A ativação de receptores de NMDA e o próprio  $\text{Ca}^{2+}$  (HILL; SCHAEFER, 2009; KIM; HWANG, 2013; MACPHERSON *et al.*, 2007) também são ativadores endógenos do receptor. Estes compostos podem ainda ser classificados quanto a sua natureza e características como naturais ou sintéticos, irritantes ou voláteis (para revisão ver, ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012). O TRPA1 também foi considerado, inicialmente, um termosensor, ativado pelo frio nocivo ( $\leq 17^\circ\text{C}$ ) (STORY *et al.*, 2003), porém a baixa reprodutibilidade destes achados acendeu o debate sobre esta questão. Recentemente, um estudo parece ter explicado esta divergência. Os autores demonstraram que o frio ativa o receptor TRPA1 de ratos e camundongos, mas não o de humanos e macacos, justificando os achados controversos da literatura através da diferença entre espécies (CHEN *et al.*, 2013), um importante fator aqui mencionado anteriormente.



**Figura 4. Estrutura química dos agonistas do receptor TRPA1.**  
Adaptado de ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012.

Existem 7 compostos descritos como antagonistas seletivos do receptor TRPA1, dos quais cinco são inibidores patenteados (Fig. 5). Dentre eles o mais amplamente estudado e bastante seletivo, o HC030031 [2-(1,3-dimetil-2,6-dioxi-1,2,3,6-tetraidropurina-7-álil)-N-[4-(propa-2-il]fenil] acetamida], e o mais potente dentre os compostos o AP-18 [(Z)-4-(4-clorofenil)-3-metilbut-3-em-2-oxima] (para revisão ver, VIANA e FERRER-MONTEL, 2009).



**Figura 5. Estrutura química dos antagonistas do receptor TRPA1.** Retirado de VIANA; FERRER-MONTIEL, 2009.

### 1.2.2 Os TRPs e a doença de Alzheimer

Até o presente momento não existem evidências na literatura da participação direta do receptor TRPA1 na etiologia, neurobiologia, desencadeamento ou progressão da doença de Alzheimer. Escassos são os trabalhos existentes na literatura que versam sobre a participação dos TRPs na DA. Um importante trabalho de revisão apontou para o potencial terapêutico dos receptores TRPCs, principalmente o TRPC6, o TRPC1 e o TRPC5, além do TRPM2, TRPM7 e do TRPV1 (YAMAMOTO *et al.*, 2007). Durante a realização deste

trabalho de tese, dois trabalhos inéditos foram publicados relatando a participação do TRPC6 e do TRPM2 na toxicidade induzida por A $\beta$ Os (OSTAPCHENKO *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015).

### **1.3 Hipótese**

Considerando as informações da literatura acima apresentadas, é possível observar alguns fatores em comum, entre o TRPA1 e a DA. Muitos estudos tem evidenciado a participação do TRPA1 no processo inflamatório e no estresse oxidativo; ambos os processos estão intimamente ligados ao desencadeamento e progressão da DA. Ademais, todos os compostos endógenos que ativam o TRPA1 estão também expressos de maneira excessiva ou apresentam-se muito ativados/elevados durante a progressão da DA. Portanto, a hipótese deste trabalho é que ocorre a ativação do receptor TRPA1 durante a iniciação e progressão da DA, promovendo uma potencialização dos processos inflamatório e oxidativo.

### **1.4 Justificativa**

A utilização de um modelo experimental na pesquisa básica, a identificação de alvos moleculares e a aplicação destes para o tratamento de doenças em seres humanos consiste em um longo caminho, nem sempre totalmente trilhado. A realização deste trabalho de tese objetivou demonstrar e ressaltar a necessidade de estudos que sejam os mais embasados e replicáveis possíveis. Desta forma, haverá maior possibilidade de translação e contribuição destes estudos, para a



descoberta de novos alvos terapêuticos e novos fármacos para o tratamento de doenças humanas, aqui em questão, a doença de Alzheimer. Considerando os aspectos demográficos, o aumento da expectativa de vida, os fatores de risco para a DA e, principalmente, a defasagem na terapia farmacológica, é essencial investigar novos alvos moleculares que possam futuramente servir de base para o desenvolvimento de novos fármacos, objetivando a eficácia no tratamento desta doença.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar a possível participação do Receptor de Potencial Transitório Anquirina Tipo 1 (TRPA1) na iniciação e na progressão da doença de Alzheimer.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar o perfil de expressão do receptor TRPA1 nas diferentes células do sistema nervoso central: neurônios, astrócitos e microglias, bem como a sua presença em sinapses;
- Investigar o possível papel do receptor TRPA1 na toxicidade induzida pelos A $\beta$ Os;
- Investigar a possível interação (receptor-alvo) entre os receptores TRPA1 e os A $\beta$ Os;
- Avaliar o possível impacto do acúmulo de A $\beta$ Os sobre a expressão do receptor TRPA1 em diferentes modelos experimentais relacionados a DA;
- Investigar o envolvimento do receptor TRPA1 no déficit de memória induzido pelos A $\beta$ Os;
- Determinar o possível efeito benéfico do antagonismo do receptor TRPA1 sobre a memória, as sinapses, a formação de oligômeros e placas amilóides e a ativação microglial nos diferentes modelos experimentais;



## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Considerações éticas e experimentais

#### 3.1.1 Considerações éticas

O presente estudo foi conduzido segundo os padrões internacionais do bem-estar animal recomendados no Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do *National Institutes of Health* dos Estados Unidos da América (Publicação do NIH, No. 85-23, revisado em 1996). Os procedimentos experimentais aqui realizados foram também conduzidos de acordo com a recomendação da Lei Brasileira (#11.794 – 08/10/2008) que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e foram previamente aprovados pelos comitês de ética das respectivas universidades nas quais o estudo foi conduzido. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob o número de protocolo PP00625 (Anexo A) e pelo *The Northwestern University Animal Care and Use Committee* (NUACUC), sob o número de protocolo 20143406 (Anexo B). Todos os procedimentos foram executados de maneira a minimizar o sofrimento e o número dos animais utilizados.

#### 3.1.2 Considerações experimentais

O tamanho amostral mínimo e adequado para cada teste foi calculado tendo como base dados prévios do laboratório, objetivando assim otimizar as análises

estatísticas e o número de informações relevantes a serem extraídas de cada experimento. O tamanho amostral utilizado em cada experimento está descrito nas legendas das figuras correspondentes.

Ademais, toda a confecção deste trabalho, desde seu planejamento, passando pela execução, terminando na sua exposição na forma escrita (artigos e tese) seguiram as diretrizes *ARRIVE* (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) (KILKENNY *et al.*, 2010). Todos os experimentos apresentados nesta tese foram repetidos por no mínimo duas vezes, de maneira independente, com exceção dos experimentos comportamentais, cujas repetições foram feitas quando possível e justificável.

## **3.2 Animais**

Para a realização deste estudo foram utilizados 4 modelos animais distintos. A criação e manutenção dos animais esteve em conformidade com protocolos adotados por cada universidade nas quais os experimentos foram realizados. Descrições e detalhes de cada animal são fornecidos abaixo.

### **3.2.1 Camundongos Swiss**

Camundongos machos da linhagem *Swiss* pesando entre 30 e 40 g (3 meses de idade) e provenientes do biotério setorial do Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX) do Departamento de Farmacologia da UFSC, obedecendo os padrões *SPF* (Specific-pathogen-free), foram submetidos à injeções intracerebroventriculares de oligômeros do peptídeo  $\beta$ -

amilóide (A $\beta$ ) de duas sequências diferentes A $\beta$ <sub>1-40</sub> e A $\beta$ <sub>1-42</sub>, ou os respectivos veículos. Esta abordagem constitui um modelo de neuroinflamação relacionado a doença de Alzheimer (DA).

### 3.2.2 Camundongos transgênicos 5xFAD

Camundongos machos transgênicos (TG) 5xFAD [APPSxFILon, PSEN1\*M146L\*L286V]6799Vas/Mmjax] pesando entre 35 e 50 g (7-9 meses de idade) e provenientes da empresa *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, EUA; #006554), obedecendo os padrões *SPF* (Specific-pathogen-free), foram procriados mantendo os cruzamentos com animais não transgênicos da linhagem B6SJLF1 e foram mantidos durante a experimentação no biotério setorial do Departamento de Neurobiologia da *Northwestern University* (Evanston, IL, EUA). Os controles utilizados para estes animais foram camundongos *Wild-type* (WT) B6SJLF1, da mesma idade e da mesma ninhada. Os animais 5xFAD superexpressam cinco diferentes mutações que estão presentes em portadores da DA familiar, sendo 3 delas para o gene da APP(695): *Swedish* (K670N, M671L), *Florida* (I716V) e *London* (V717I), e as outras duas mutações (M146L) e (L286V), para o gene da PS1. Os camundongos 5xFAD apresentam produção de A $\beta$ Os, e formação tanto de amilóide intraneuronal quanto de fibrilas dispostas em placas amilóides, sendo considerados um modelo experimental da DA.

### 3.2.3 Camundongos TRPA1 KO

Camundongos machos *knockout* (KO) homozigotos para o TRPA1 (B6;129P-Trpa1<sup>tm1Kyk<sup>w</sup></sup>/J), pesando entre 25 e 35 g (2-3 meses de idade) e provenientes da empresa *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, EUA; #006401), obedecendo os padrões SPF (Specific-pathogen-free) foram utilizados. Os animais foram mantidos durante a experimentação no biotério setorial do Departamento de Neurobiologia da *Northwestern University* (Evanston, IL, EUA). Os controles utilizados para estes animais foram camundongos da linhagem B6129PF2 (#100903) – que são também utilizados como *background* para procriação – da mesma idade e peso. O camundongos TRPA1 KO são produtos de modificação genética através do uso de vetor de abordagem seletiva, que contém um sinal de retenção no retículo endoplasmático e um gene sinalizador IRES-PLAP para as células que expressam este receptor. Estes animais foram submetidos a injeções intracerebroventriculares de AβOs<sub>42</sub> ou do respectivo veículo.

### 3.2.4 Ratos Wistar e Sprague-Dawley

Ratos fêmeas da linhagem *Wistar* pesando entre 250 e 300 g (3 meses de idade) provenientes do biotério setorial do LAFEX do Departamento de Farmacologia da UFSC e ratos fêmeas da linhagem *Sprague-Dawley* pesando entre 250 e 300 g (3 meses de idade) provenientes do biotério setorial do Departamento de Neurobiologia da *Northwestern University* foram utilizados neste estudo. Ambos foram criados obedecendo os padrões SPF (Specific-pathogen-free).



Estes animais foram utilizados para a obtenção de embriões com 18 dias de gestação, com a finalidade de preparação de culturas primárias. Ainda, na *Northwestern University*, os encéfalos dos ratos fêmeas, após a extração dos embriões, foram utilizados para a obtenção de sinaptossomas do córtex.

Todos os animais foram mantidos em câmaras ventiladas com temperatura ( $22 \pm 2$  °C), umidade (60 – 80 %) e luminosidade (ciclo de claro/escuro de 12 horas) controladas, conforme o padrão de cada universidade. Os padrões quanto a criação e manutenção dos animais para as duas universidades é muito similar, exceto no que se refere ao ambiente da caixa moradia, que, para a universidade norte-americana adota o ambiente enriquecido como padrão. Água e ração foram providas *ad libitum*, exceto durante a execução dos protocolos comportamentais, que foram realizados sempre entre 8:00 e as 16:00 horas. Os animais permaneceram nas salas de experimentação durante um período de adaptação de pelo menos 1 h antes da realização dos testes comportamentais.

### **3.3 Cultura primária de células**

#### ***3.3.1 Cultura primária de neurônios hipocampais***

A cultura primária neuronal foi realizada como previamente descrito na literatura (GONG *et al.*, 2003), com pequenas modificações. Foi realizada a partir de embriões de ratos (E18) da linhagem *Sprague-Dawley* ou *Wistar* – dependendo da universidade onde foram realizadas as culturas – obtidos de ratos fêmeas com 18

dias de gestação como descrito no item 3.2.4. Foi realizada uma laparotomia para extração do saco uterino contendo os embriões no dia 18 da gestação. Em seguida, os embriões foram decapitados e os seus encéfalos removidos e transferidos para uma placa de Petri contendo meio Hibernate E gelado (Gibco; Grand Island, NY, EUA; #A1247601). Com o auxílio de uma lupa, as meninges foram retiradas e a formação hipocampal (FH) dos animais foi dissecada, sob gelo. O tecido obtido foi fracionado com auxílio de um bisturi estéril. Após a transferência do tecido para um tubo Falcon®, as células foram dissociadas mecanicamente com pipeta Pasteur de vidro flambada e depois foram centrifugadas a 1000 r.p.m. durante 4 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi recolhido e foi adicionada ao tubo solução de papaína (2 mg/mL), diluída em meio Hibernate E, previamente filtrada e aquecida a 37 °C em banho maria. A solução de papaína foi incubada por 30 min a 30 °C em agitador vertical. O tubo foi então centrifugado a 1000 r.p.m. durante 4 min a temperatura ambiente. A seguir, o sedimento de células foi recolhido com o auxílio de uma pipeta e transferido para um novo tubo Falcon ao qual foi adicionado 2 mL de meio Neurobasal (Gibco; Grand Island, NY, EUA; #21103049) suplementado com 2 % B27 (Gibco; Grand Island, NY, EUA; #175004044), 0.25 % L-Glutamina 200 mM e 1 % penicilina-estreptomicina. As células foram então suavemente ressuspensas com pipeta Pasteur de vidro de ponta flambada e a estimativa do número de células viáveis foi realizada através da coloração de nigrosina e a contagem em câmara de Neubauer (20 µl da suspensão de células + 180 µl de solução nigrosina 0,3 % em HBSS). As células foram plaqueadas em meio Neurobasal suplementado em lamínulas de vidro de 15 mm esterilizadas tratadas com poli-L-lisina na

concentração de 10 µg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA; #P2636), para a realização da técnica de imunocitoquímica, ou em placas de 40 mm previamente tratadas com poli-L-lisina para a realização da técnica de *western blotting*, ou ainda em placas de 96 poços também tratadas com poli-L-lisina para a realização das técnicas experimentais de excitotoxicidade celular com fluoróforos. As culturas foram mantidas a 37 °C em estufa contendo 5 % de CO<sub>2</sub>. Meio de cultura novo foi adicionado a cada 5 dias até a execução dos experimentos, aproximadamente 15 DIV (Dias In Vitro) ou 21 DIV, dependendo do protocolo realizado.

### 3.3.2 Cultura primária de astroglias corticais

A cultura primária astrogial (astrócitos e microglias) foi realizada a partir de embriões de ratos (E18) da linhagem *Sprague-Dawley* obtidos de ratos fêmeas com 18 dias de gestação como descrito no item 3.2.4. No dia 18 de gestação foi realizada uma laparotomia, para extração do saco uterino contendo os embriões. Em seguida, os animais foram decapitados e os cérebros foram removidos e transferidos para uma placa de Petri contendo meio Hibernate E (Gibco; Grand Island, NY, EUA; #A1247601). Com o auxílio de uma lupa, as meninges foram retiradas e o córtex dos animais foi dissecado. O tecido obtido foi fracionado com auxílio de um bisturi estéril e, após a transferência do tecido para um tubo Falcon, as células foram então dissociadas mecanicamente com pipeta Pasteur de vidro em solução contendo tripsina (0,25 %) e centrifugadas a 1000 r.p.m. por 5 min à temperatura ambiente. Após a remoção do sobrenadante, as células foram ressuspensas em meio DMEM (Cellgro; Manassas, VA, EUA #10010CV)

suplementado com 0,6 % glicose, 1 % penicilina-estreptomicina e 10 % de soro de cavalo. As células foram então cultivadas em garrafas, contendo meio de cultura e mantidas a 5 % de CO<sub>2</sub> e a temperatura de 37 °C até atingirem confluência formando uma monocamada celular (aproximadamente 14 DIV). O meio de cultura foi trocado a cada dois dias, até a confluência das células.

Para realização dos protocolos de imunocitoquímica, após atingir a confluência na garrafa, o meio foi aspirado e as células foram lavadas duas vezes com PBS aquecido a 37 °C. As garrafas foram então submetidas à 1 mL de Tripsina-EDTA 0,25 % por 3 min a 37 °C na estufa. Em seguida, foi adicionado à garrafa meio DMEM suplementado (15 mL) e as células passaram por suave agitação com o auxílio de uma pipeta. O meio contendo as células em suspensão foi coletado e transferido para um tubo Falcon que foi centrifugado a 1000 r.p.m. por 10 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e meio DMEM suplementado foi adicionado (10 mL). A estimativa do número de células viáveis foi realizada através da coloração de nigrosina e a contagem em câmara de Neubauer (20 µl da suspensão de células + 180 µl de solução nigrosina 0,3 % em HBSS). O plaqueamento foi realizado em lâminulas de vidro de 15 mm esterilizadas, tratadas com poli-L-lisina na concentração de 10 µg/mL para a realização da técnica de imunocitoquímica. As culturas foram mantidas a 37 °C, em estufa contendo 5 % de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias, até a realização dos experimentos.

### 3.3.2.1 Cultura primária de microglias corticais

Algumas garrafas de culturas astrogliais contendo camada confluyente de células (14 DIV) passaram por um procedimento para separação das células microgliais das células astrocitárias. Primeiramente, o meio foi aspirado e as células foram lavadas duas vezes com PBS a 37 °C. Em seguida, foi adicionado à garrafa meio DMEM suplementado (15 mL) e a garrafa foi agitada vigorosamente por 10 s. Segundo este protocolo, sob agitação as células microgliais desgrudam-se da monocamada celular, deixando em sua maioria (90 %) os astrócitos aderidos à garrafa. O meio contendo as células microgliais foi então removido e a estimativa do número de células viáveis foi realizada através da coloração de nigrosina e a contagem em câmara de Neubauer (20 µl da suspensão de células + 180 µl de solução nigrosina 0,3 % em HBSS). O plaqueamento foi realizado em placas de 40 mm previamente tratadas com poli-L-lisina a 10µg/mL para a realização da técnica de *western blotting* ou em lamínulas de vidro de 15 mm esterilizadas e também tratadas com poli-L-lisina, para a realização da técnica de imunocitoquímica. As culturas foram mantidas a 37 °C em estufa contendo 5 % de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias, até a realização dos experimentos.

### 3.3.2.2 Cultura primária de astrócitos corticais

As garrafas contendo as culturas celulares que passaram pelo processo de separação de microglias foram também tratadas para plaqueamento dos astrócitos remanescentes aderidos. As células foram lavadas três vezes com PBS a 37 °C e em seguida foi

adicionado à garrafa 1 mL de Tripsina-EDTA 0,25 % por 3 min em estufa a 37°C. Após, meio DMEM suplementado (15 mL) foi adicionado à garrafa e as células passaram por suave agitação com o auxílio de uma pipeta. O meio contendo as células em suspensão foi coletado e transferido para um tubo Falcon, para posterior centrifugação a 1000 r.p.m. por 10 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e meio DMEM suplementado foi adicionado (10 mL). A estimativa do número de células viáveis foi realizada através da coloração de nigrosina e a contagem em câmara de Neubauer (20 µl da suspensão de células + 180 µl de solução nigrosina 0,3 % em HBSS). O plaqueamento foi realizado em lamínulas de vidro de 15 mm esterilizadas tratadas com poli-L-lisina para a realização da técnica de imunocitoquímica. As culturas foram mantidas a 37 °C em estufa contendo 5 % de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias, até a realização dos experimentos.

### *3.3.3 Cocultura de neurônios hipocampus e astroglias corticais*

O procedimento de co-cultura primária foi realizado como reportado anteriormente (KAECH; BANKER, 2006), com algumas modificações. Neste protocolo neurônios hipocampus foram plaqueados sobre lamínulas de vidro, que foram posteriormente invertidas sobre placas contendo monocamada de astroglia. Em placas de 40 mm foram plaqueadas células astrogliais em meio DMEM suplementado com 1 % N2 (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA; #17502048) e 0,6 % glicose, conforme descrito no item 3.3.2. Este procedimento foi realizado 24 h antes do plaqueamento

das células hipocâmpais em lâminulas contendo pontos de parafina. Para isso, lâminulas de vidro de 25 mm foram tratadas com solução de ácido nítrico 10 N por 16-18 h a temperatura ambiente. Decorrido este período de tempo, foram lavadas por 3 vezes, com duração de 2 h, com água destilada e em seguida, submersas em álcool 100 % e depois separadas sob papel filtro para secagem. Em seguida, as lâminulas foram autoclavadas e posteriormente, já em fluxo laminar, receberam quatro pontos de parafina de aproximadamente 2 mm de diâmetro em suas extremidades. As lâminulas foram tratadas com poli-L-lisina na concentração de 10 µg/mL, seguida de lavagem com água estéril e posterior secagem sob parafilme em fluxo laminar contínuo. Os pontos de parafina permitem a distância ideal entre as camadas de cultivos. As células neuronais primárias hipocâmpais foram obtidas conforme descrito no item 3.3.1 e semeadas em meio Neurobasal Suplementado, nas lâminulas contendo pontos de parafina, incubadas em estufa a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub> por no mínimo 3 h, para garantir a adesão dos neurônios. A co-cultura foi finalizada quando as lâminulas de vidro contendo neurônios hipocâmpais foram invertidas sobre as placas contendo astrogliã. As placas contendo as co-culturas foram mantidas em estufa contendo 5 % de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi adicionado a cada cinco dias, até a realização dos experimentos, que ocorria usualmente após 21 DIV.

### **3.4 Tecido encefálico de humanos**

O tecido cortical e cerebelar de encéfalos de humanos portadores da DA e controles saudáveis, compatíveis em idade e sexo, foram gentilmente cedidos

pelo banco de cérebros *Cognitive Neurology and Alzheimer's Disease Center* (CNADC) – situado em Chicago, Illinois, EUA – ao laboratório do Professor William Klein, do Departamento de Neurobiologia da *Northwestern University*, onde os experimentos com encéfalos de humanos foram realizados. Foram utilizadas 3 amostras de encéfalo de portadores da DA (diagnosticados *post-mortem* por análise histopatológica, somada ao diagnóstico clínico) e 3 amostras de encéfalo de controles saudáveis ou não-dementes (ND). As amostras encontravam-se armazenadas em freezer -80 °C.

### **3.5 Oligomerização dos peptídeos A $\beta$**

Para a realização deste estudo foram utilizadas duas preparações distintas, quanto à sua fração, de oligômeros do peptídeo A $\beta$  (A $\beta$ Os), além de uma preparação fluorescente de A $\beta$ Os, as quais serão descritas a seguir.

#### **3.5.1 Preparação e caracterização dos A $\beta$ Os fração 1-40 (A $\beta$ Os<sub>40</sub>)**

O peptídeo humano A $\beta$  fração 1-40 (Abbiotec LLC, San Diego, CA, EUA; #350016) foi submetido ao processo de agregação e/ou oligomerização como descrito anteriormente (BICCA *et al.*, 2015; MEDEIROS *et al.*, 2007). O peptídeo foi dissolvido na concentração de 1 mg/mL em tampão PBS estéril (pH 7,4) e posteriormente incubado a 37 °C em banho-maria por 4 dias. A preparação foi separada em estoques de 100  $\mu$ l e armazenadas a -20 °C, até o momento do uso. O veículo



(VEIC) desta preparação é constituído de PBS estéril. A caracterização dos oligômeros presentes na preparação foi realizada através de coloração de nitrato de prata em gel nativo de poliacrilamida submetido à eletroforese, cromatografia líquida de alta eficiência e microscopia eletrônica de transmissão (MET) (dados não mostrados). O controle do estado de agregação foi feito com uma preparação do peptídeo A $\beta$ <sub>1-40</sub> dissolvido em tampão PBS, porém, que não foi submetido ao processo de incubação.

### *3.5.2 Preparação e caracterização dos A $\beta$ Os fração 1-42 (A $\beta$ Os<sub>42</sub>) e A $\beta$ Os<sub>42</sub> fluorescentes (FAM-A $\beta$ Os<sub>42</sub>)*

O peptídeo humano A $\beta$  fração 1-42 (Bachem Inc., Torrance, CA, EUA; #62080) ou o peptídeo humano A $\beta$  fração 1-42 conjugado à amidita de fluoresceína (FAM) (Anaspec, Fremont, CA, EUA; #AS23525) foi submetido ao processo de agregação e/ou oligomerização como descrito anteriormente (LAMBERT *et al.*, 1998, 2007). O peptídeo necessário para cada experimento foi solubilizado na concentração de 1 mM em HFIP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA; #52517) gelado, resultando uma solução límpida e incolor, que foi incubada a temperatura ambiente durante 60 min, com o intuito de permitir a estabilização de monômeros. Ultrapassado o período de incubação, a solução foi colocada novamente em gelo por no mínimo 60 min para evitar a evaporação durante o processo de preparação das alíquotas. As alíquotas foram preparadas em microtubos siliconizados (Axygen, Glendale, AZ, EUA; #MCT175LC), em capela de fluxo laminar, e ali permaneceram durante um período de 12 h, com as tampas abertas, para permitir a evaporação do HFIP. A eliminação completa dos

resíduos de HFIP foi realizada utilizando um centrífuga de concentração Savant SpeedVac® (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) por 10 min. Os microtubos contendo películas finas e transparentes (filme) de A $\beta$  foram estocados em freezer -80 °C até o momento do término da preparação. As alíquotas foram dissolvidas em 10  $\mu$ l de DMSO fresco e anidro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA; #D2650) até a completa solubilização do filme. Em seguida foram adicionados 490  $\mu$ l de meio Ham's F12 estéril sem vermelho de fenol (Caisson Laboratories, Smithfield, UT, EUA; #HFL05) e passadas no agitador de tubos vórtex por 10 s. O veículo (VEIC) é constituído pela mistura dos mesmos volumes de DMSO e Ham's F12, nas mesmas condições. As preparações de A $\beta$ O<sub>42</sub> e veículo foram centrifugadas a 14.000 r.p.m. por 10 min a temperatura de 4°C. O sobrenadante foi então coletado e alíquotado em um novo microtubo, sendo que os possíveis sedimentos formados durante a centrifugação constituíam agregados insolúveis de A $\beta$  (fibrilas e protofibrilas, por exemplo). As preparações foram mantidas a 4 °C até a sua utilização (máximo 4 dias). A concentração de A $\beta$ O<sub>s</sub> nas preparações foi determinada por método de BCA para quantificação de proteínas (Pierce, Rockford, IL, EUA). A caracterização dos oligômeros presentes na preparação foi realizada através de *western blotting* utilizando um anticorpo monoclonal altamente seletivo contra A $\beta$ O<sub>s</sub> (NU2), desenvolvido pelo grupo do Professor Dr. William Klein (*Northwestern University*, Evanston, IL, EUA). O conjugado FAM apresenta absorção máxima em 494 nm e emissão máxima de 521 nm.

### 3.6 Injeção intracerebroventricular dos A $\beta$ Os

Uma única injeção *free hand* intracerebroventricular (i.c.v.) dos A $\beta$ Os é um modelo animal útil para o estudo da neuroinflamação e estresse oxidativo agudos, que são correlacionados às alterações observadas nas fases iniciais da DA. Este procedimento foi realizado nos animais *Swiss* e nos animais TRPA1 KO. Após a preparação do oligômeros e a confirmação do estado de agregação, como descrito previamente no item 3.5., os A $\beta$ Os<sub>40</sub> e A $\beta$ Os<sub>42</sub> foram administrados por via intracerebroventricular (i.c.v.), como descrito previamente (BICCA *et al.*, 2011; MEDEIROS *et al.*, 2007; PREDIGER *et al.*, 2007). Os animais foram anestesiados usando isoflurano 2,5 % e um sistema vaporizador (SurgiVet Inc., Waukesha, WI, EUA) e gentilmente contidos com as mãos para a realização da injeção. O local da injeção foi esterilizado com gaze embebida em álcool 70%. Sob anestesia leve (ou seja, apenas o suficiente para perder o reflexo postural), uma agulha 22 G foi inserida unilateralmente 1 mm à direita do ponto equidistante da linha média de cada olho e 1 mm posterior a uma linha traçada através da base anterior dos olhos (LAURSEN; BELKNAP, 1986). Um volume de 3  $\mu$ l das soluções contendo A $\beta$ Os<sub>40</sub> (400 pmol/sítio) ou A $\beta$ Os<sub>42</sub> (10 pmol/sítio) e/ou os seus respectivos veículos foi injetado no ventrículo lateral nas seguintes coordenadas a partir do bregma: ântero-posterior (AP) = -0,22 mm, médio-lateral (ML) = 1 mm, e dorsoventral = -3 mm. A inserção precisa da agulha no local de injeção (traço da agulha) nos animais tratados foi confirmada no momento da dissecação do tecido encefálico, antes de realizar os procedimentos para as análises moleculares. Os resultados dos camundongos que apresentaram sinais de inserção incorreta da agulha

ou qualquer sinal de hemorragia cerebral foram excluídos da análise estatística (< 5%).

### **3.7 Antagonistas e agonista do receptor TRPA1**

O HC030031 [2-(1,3-dimetil-2,6-dioxi-1,2,3,6-tetraidropurina-7-alil)-N-[4-(propa-2-il)fenil] acetamida], antagonista seletivo e não-competitivo do receptor TRPA1, também denominado somente de HC, foi sintetizado no Departamento de Química da UFSC, como descrito pela Organização Mundial de Propriedade Intelectual (LERNER, 2008), e seu grau de pureza foi superior a 98%. O AP-18 [4-(4-Clorofenil)-3-metilbut-3-en-2-oxima], antagonista seletivo e competitivo do receptor TRPA1, e o cinamaldeído [trans-3-fenil-2-propenal], agonista seletivo do receptor TRPA1, também denominado CNH, foram comprados da empresa Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), sob números de catálogo #55224-94-7 e #239968, respectivamente.

### **3.8 Testes comportamentais *in vivo***

#### **3.8.1 Reconhecimento de Objetos (RO)**

O teste de reconhecimento de objetos (RO) foi utilizado em diferentes protocolos. Em alguns protocolos o RO foi realizado 14 dias após a injeção i.c.v de A $\beta$ Os<sub>40</sub> ou A $\beta$ Os<sub>42</sub>, ou dos seus respectivos veículos, em camundongos *Swiss*. Os animais foram pré-tratados com VEIC (9% DMSO, 1% Tween 80 em 0,9% solução NaCl) ou com HC030031 (3  $\mu$ M/sítio i.c.v.; 9  $\mu$ mol/ $\mu$ l) em uma

única injeção, 30 min antes da injeção i.c.v. de AβOs. Em protocolo similar, animais TRPA1 KO e seus respectivos controles foram testados no RO 14 após a injeção i.c.v. de AβOs<sub>42</sub> ou VEIC. Em outro protocolo, o RO foi realizado 14 dias após a injeção i.c.v. de VEIC ou AβOs<sub>40</sub>. Em seguida, os animais foram então tratados por via oral, uma vez ao dia, com VEIC ou HC030031 (20 mg/kg) durante 14 dias, e em seguida retestados no RO. Ainda, o RO foi utilizado para os teste dos animais 5xFAD TG e seus respectivos controles com idade de 7 meses. Finalmente, em um último protocolo os animais 5xFAD TG e seus respectivos controles foram testados com idade de 9 meses. Os tratamentos com o VEIC ou o HC030031 (20 mg/kg) por via oral, uma vez ao dia, iniciaram-se com a idade de 7 meses e duraram por 60 dias. A memória espacial dos animais foi acessada através da sua habilidade de reconhecer um objeto familiar e um objeto novo, como anteriormente descrito (BICCA *et al.*, 2015), com pequenas modificações. Os objetos utilizados no teste eram feitos de plástico, tinham diferentes tamanhos, formatos, cores e texturas e, testes preliminares mostraram que os animais não apresentavam preferência por nenhum deles. A arena de teste e os objetos foram limpos entre as sessões de teste com álcool 20 % (v/v), com o intuito de minimizar as pistas olfatórias. O teste do RO foi composto inicialmente por 2 sessões, habituação e treino, de 6 min de duração cada, com um intervalo de 3 min entre cada sessão. O teste foi realizado em uma arena de campo aberto com uma pista visual afixada em uma das paredes. Durante a sessão de habituação os animais foram posicionados na arena (de frente para a pista visual) e deixados para explorar livremente a área durante toda a sessão. Na sessão de treino os animais foram colocados no centro da arena de frente para a pista visual, desta vez a arena

continha dois objetos idênticos. Todas as sessões foram gravadas em vídeos e analisadas por dois diferentes pesquisadores, treinados e cegos para o tratamento. Na sessão de habituação foram analisados o número de linhas que o animal cruzou no chão da arena (cruzamentos) e o número de elevações sob duas patas (levantadas) que denotam a locomoção e a exploração do animal, respectivamente, além da velocidade média do animal que é automaticamente avaliada pelo programa de vídeo utilizado (dados não mostrados). Desta maneira, a possível interferência de déficits motores e exploratórios nos testes, provenientes de qualquer tratamento, foram excluídos. Durante a sessão de treino foi analisado o tempo de exploração de cada objeto. O comportamento de cheirar e tocar o objeto, bem como a aproximação intencionada, foram considerados comportamentos exploratórios. Por fim, a sessão de teste ocorreu 24 h após a sessão de treino, na qual um dos dois objetos utilizados durante a sessão de treino (F; objeto familiar) foi substituído por um novo objeto (N). O reteste no RO consistiu em colocar o novo objeto em uma nova posição na arena. A sessão de teste e reteste também foram gravadas em vídeo e foram analisados o tempo gasto explorando o objeto familiar e o objeto novo. Os resultados foram expressos como a porcentagem de exploração de cada objeto em relação ao tempo total explorando os dois objetos, durante a sessão de teste. Os animais que reconhecem o objeto familiar, ou seja, que aprenderam a tarefa durante a sessão de treino, exploram o objeto novo durante a sessão de teste por um tempo significativamente maior que 50 % do tempo total de exploração.

### 3.8.2. Teste de esQUIVA passiva “step down”

O teste de esQUIVA passiva foi utilizado para avaliação dos animais 14 dias após a injeção i.c.v de VEIC ou de A $\beta$ Os<sub>40</sub> em camundongos Swiss. Os animais foram tratados em dois protocolos diferentes com VEIC (9% DMSO, 1% Tween 80 em 0,9% solução NaCl) ou HC030031 (3  $\mu$ M/sítio i.c.v.) em uma única injeção 30 min antes da injeção i.c.v. de A $\beta$ Os. O teste de esQUIVA passiva foi realizado como descrito anteriormente (AGUIAR *et al.*, 2011), com pequenas modificações. Neste teste, foi utilizada uma caixa experimental confeccionada em alumínio (2 mm de espessura e pintura epóxi de alto impacto na cor bege claro), a qual possui o fundo constituído por barras de aço inoxidável (espaçamento de 12,5 mm entre cada barra) com área interna de fuga de 200 mm x 75 mm. A porta e frente da caixa são feitas de acrílico transparente para a visualização e retirada do animal. O aparato possui ainda uma bandeja coletora de dejetos e urina, que é retirada e higienizada a cada troca de animal com álcool 20 % (v/v). As barras de aço estão conectadas a um disparador de choque elétrico Bi-volt (127/220 V) que possui faixas de corrente máxima de 100  $\mu$ A a 2000  $\mu$ A, e faixas de duração de 100 ms a 30000 ms (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Esta caixa foi desenvolvida para a realização de testes com ratos e é adaptada para a utilização de camundongos da seguinte forma: a área de permanência de ratos (área de fuga) é fechada, formando um retângulo justaposto às barras presentes no fundo, onde é inserida uma plataforma de madeira escura quadrada (4 cm x 4 cm) exatamente no meio do aparato. Durante a sessão de treino, os animais foram colocados sobre a plataforma de madeira e receberam um choque elétrico (0.4 mA) por 2 s, exatamente no

momento em que desceram com as 4 patas da plataforma para a grade de aço. Foi registrada a latência do animal para descer da plataforma. Os animais que apresentarem na sessão de treino tempo inferior a 1 s ou superior a 40 s, para descer com as 4 patas da plataforma, foram excluídos do teste (n=3). Os testes (sem choque) foram realizados 24 h após a sessão de treino, para avaliar a memória dos animais. Durante a sessão de teste, foi considerado como parâmetro de memória, a latência para o animal descer da plataforma. O tempo máximo de duração dos testes (permanência do animal sobre a plataforma) foi de 3 minutos (180 s). Após este período, os animais foram retirados da plataforma.

### **3.9 Testes de toxicidade *in vitro***

#### ***3.9.1 Determinação do potencial de membrana mitocondrial***

As possíveis variações no potencial de membrana mitocondrial (PMM) foram avaliadas através da utilização do cátion lipofílico JC-1 em um método previamente descrito na literatura (COSSARIZZA *et al.*, 1993). Para realização deste experimento, os neurônios hipocâmpais foram obtidos como descrito anteriormente no item 3.3.1, semeados em placas de 96 poços e mantidos por 17 DIV. Os neurônios foram então tratados com VEIC ou com HC030031 (0,03  $\mu$ M) por 30 min antes da incubação de A $\beta$ Os<sub>40</sub> (1  $\mu$ M) e A $\beta$ Os<sub>42</sub> (500 nM) e/ou os seus respectivos veículos durante 3-4 h. Ainda, utilizamos o AP-18 (0,03  $\mu$ M), para fins de comparação entre o efeito dos antagonistas do TRPA1. Decorridos os períodos de tratamento, foi adicionada, aos poços de cada



tratamento, a sonda JC-1 (Gen Script, Piscataway, NJ, EUA; #L00291) na concentração de 1  $\mu\text{L/mL}$  em meio Neurobasal, por 30 minutos em estufa, protegidos da luz. Os poços foram lavados três vezes com PBS aquecido, para a remoção do fluoróforo não ligado, em seguida foi adicionado meio Neurobasal (sem vermelho de fenol) e as placas foram imediatamente levadas para leitura da emissão de fluorescência em leitor fluorescente/quimioluminescente modelo Gemini EM (Molecular Devices) situado no *Keck Biophysics Facility* da *Northwestern University*. Neste ensaio, foi incluído o FCCP (10 mM), um translocador de prótons que induz o colapso do potencial de membrana mitocondrial, como controle positivo, incubado por 1 h antes da adição do JC-1. A determinação do potencial de membrana mitocondrial foi realizada através do cálculo da relação entre a fluorescência vermelha da sonda (quando o JC-1 encontra-se na forma de agregados; excitação/emissão 488–590 nm) sobre a fluorescência verde (quando o JC-1 encontra-se na forma de monômeros; excitação/emissão 488–530 nm). O alto valor da relação denota alto PMM, que é característico em células viáveis. A baixa relação entre as fluorescências indica um baixo PMM, típico de células em apoptose. Os resultados foram determinados pela média da fluorescência de cinco poços, resultantes de dois experimentos independentes. Os dados foram obtidos em densidade óptica de fluorescência e expressos como porcentagem do controle em unidades arbitrárias.

### 3.9.2 Avaliação da formação de EROS

A produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROS) foi avaliada utilizando a sonda

fluorescente H<sub>2</sub>DCFH-DA como anteriormente descrito (LEBEL *et al.*, 1990) e modificado para cultura de células (DE FELICE *et al.*, 2007). O H<sub>2</sub>DCFH-DA é uma sonda não fluorescente que atravessa facilmente a membrana celular, sendo hidrolisada por esterases intracelulares, tornando-se, deste modo, incapaz de atravessar a membrana celular, acumulando-se assim no interior das células. Na presença de EROS, particularmente peróxidos, a sonda é então oxidada e desta maneira apresenta intensa fluorescência. A fluorescência desta sonda pode ser emitida quando excitada por um filtro de luz correspondente ao FITC. Para realização deste experimento, os neurônios hipocâmpais foram obtidos como descrito anteriormente no item 3.3.1, plaqueados em placas de 96 poços e mantidos por 17 DIV. Os neurônios foram então tratados com VEIC ou com HC030031 (0,03 µM) por 30 min antes da incubação de AβOs<sub>40</sub> (1 µM) e AβOs<sub>42</sub> (500 nM) e/ou os seus respectivos veículos durante 3-4 h. Ainda utilizamos o AP-18 (0,03µM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA; #55224-94-7), outro antagonista do TRPA1, para fins de comparação entre o efeito dos antagonistas. Decorrido o período de tempo de tratamento, as células foram incubadas por 40 min em solução de H<sub>2</sub>DCFH-DA (1 µM) em meio Neurobasal (sem vermelho de fenol), em estufa sob a penumbra. Posteriormente, os poços foram lavados duas vezes com PBS 37 °C e em seguida foi acrescentado meio novo para a posterior análise em leitor de placas modelo Infinite 200 (Tecan) situado no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), no Centro de Ciências Biológicas (CCB) da USFC ou leitor fluorescente/quimioluminescente modelo Gemini EM (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) situado no *Keck Biophysics Facility* da *Northwestern Univeristy* (excitação/emissão 488–530 nm). Neste teste,

o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foi utilizado como controle positivo da reação, na concentração de 100  $\mu\text{M}$  e foi incubado 30 min antes da adição da sonda fluorescente. Os resultados foram determinados pela média da fluorescência de cinco poços, resultantes de três experimentos independentes. Os dados foram obtidos em densidade óptica de fluorescência e expressos como porcentagem do controle, em unidades arbitrárias.

### *3.9.3 Incorporação de iodeto de propídeo*

A morte neuronal foi avaliada através do uso do composto fluorescente iodeto de propídeo (PI), amplamente utilizado para avaliar viabilidade celular e utilizado como marcador de dano neuronal (WILDE; SUNDSTRÖM; IANNOTTI, 1994). O PI é uma molécula fluorescente vermelha, avaliada em excitação/emissão 535–617 nm, que intercala-se aos ácidos nucleicos do DNA celular. É um composto impermeável nas células viáveis, portanto, quando a membrana celular se deteriora em processos de morte, o composto é capaz de interagir com o DNA. Uma vez ligada ao DNA, a molécula apresenta fluorescência aumentada em 20–30 vezes. Para realização deste experimento, os neurônios hipocámpais foram obtidos como descrito anteriormente no item 3.3.1, semeados em placas de 96 poços e mantidos por 17 DIV. Os neurônios foram então tratados com VEIC ou com HC030031 (0,03  $\mu\text{M}$ ) por 30 min antes da incubação de VEIC ou  $\text{A}\beta\text{Os}_{40}$  (1  $\mu\text{M}$ ), durante 24 h. Após o tempo de tratamento, as células foram incubadas por 30 min em solução de PI (1  $\mu\text{M}$ ) em meio Neurobasal, em estufa, e protegidos da luz. Posteriormente, os poços foram lavados duas vezes com

PBS aquecido (37 °C) e em seguida foi acrescentado meio Neurobasal aquecido para a subsequente análise em leitor de placas modelo Infinite 200 (Tecan) situado no LAMEB, CCB da USFC (excitação/emissão 488–530 nm) ou fotografadas através do uso de microscópio de fluorescência (Olympus CK40) acoplado à câmera, situado no laboratório do Professor Edmundo Grisard do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP), CCB, da UFSC. Neste teste, o Cinamaldeído (CNH) – um agonista dos receptores TRPA1 – foi utilizado como controle positivo, na concentração de 0,03 µM, incubado 3-4 h antes da adição da sonda fluorescente. Os resultados foram determinados pela média da fluorescência de cinco poços, resultantes de três experimentos independentes. Os dados foram obtidos em densidade óptica de fluorescência e expressos como porcentagem do controle, em unidades arbitrárias.

### **3.10 Imunocitoquímica**

A técnica de imunocitoquímica foi utilizada para diferentes fins: expressão de TRPA1 em neurônios, microglias e astrócitos antes e após a exposição aos AβOs<sub>40</sub> ou AβOs<sub>42</sub>, ou ainda na presença de anisomicina (ANI); avaliação da ligação dos AβOs aos dendritos neuronais, e avaliação do efeito do HC030031 sobre a ligação de AβOs em dendritos neuronais. Para a realização da técnica de imunocitoquímica as células foram obtidas como descrito no item 3.3 e plaqueadas em lamínulas previamente tratadas com poli-L-lisina incubadas em placas de 40 mm. Após o tempo decorrido de tratamento, necessário para cada experimento realizado, o meio de cultura foi aspirado das placas e

adicionado novo meio de cultura aquecido (Neurobasal) acrescido de paraformaldeído 3.7 % (1/1), e incubado na estufa a 37 °C por 10 min. Em seguida, este meio foi novamente removido e adicionado paraformaldeído 3.7 % e então as placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 10 min. Estes dois passos foram realizados com o intuito de fixação das células de uma forma não abrupta. As lamínulas foram então lavadas com PBS por três vezes de 5 min e incubadas com solução de bloqueio (10 % NGS em TBS) durante 1 h. Decorrido o tempo de bloqueio, que foi realizado objetivando reduzir a marcação inespecífica, as lamínulas foram incubadas com os anticorpos primários de interesse para cada experimento, diluídos em solução de bloqueio, à temperatura de 2-8 °C, por 14-16 h. Após, as lamínulas foram lavadas em TBS por três vezes de 10 min e procedida a incubação com o anticorpo secundário específico para cada primário utilizado (1:2000, preparado em solução de bloqueio 10 vezes diluída) por 2 h, à temperatura ambiente. O próximo passo consistiu na lavagem das lamínulas com TBS por três vezes de 10 min e montagem das lamínulas sobre lâmina de vidro com meio Prolong Gold contendo DAPI (marcador nuclear) (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA; #P36935). As imagens foram capturadas usando microscópio invertido de epifluorescência (Nikon TE2000, Melville, NY, EUA) acoplado a câmera digital, localizado no laboratório do Professor William Klein da *Northwestern University*.

### 3.10.1 Análise da expressão do TRPA1 em culturas primárias de células

A células neuronais foram obtidas como descrito no item 3.3.1. Foi realizada dupla fluorescência utilizando os seguintes anticorpos primários: policlonal *coelho* anti-TRPA1 (1:2000; Abcam, Cambridge, MA, EUA; #ab68847) e monoclonal *camundongo* anti- $\beta$ -tubulina III (1:2000; Promega, Madison, WI, EUA; #G721A) e os respectivos anticorpos secundários: *cabra* anti-*coelho* alexa 488 (#A11034) e *cabra* anti-*camundongo* alexa 555 (#A21424). As células microgliais foram obtidas como descrito no item 3.3.2. A dupla fluorescência foi realizada utilizando os primários policlonal *coelho* anti-TRPA1 (1:2000; #ab68847) e policlonal *cabra* anti-Iba-1 (1:500; #ab5076) ambos da empresa Abcam (Cambridge, MA, EUA) e os secundários *cabra* anti-*coelho* alexa 488 (#A11034) e *donkey* anti-*cabra* alexa 555 (#A21432). Finalmente, as células astrocitárias foram obtidas como descrito no item 3.3.2. A dupla marcação fluorescente foi executada utilizando o anticorpo primário policlonal *coelho* anti-TRPA1 (1:2000; #ab68847) e anticorpo primário fluorescente monoclonal *camundongo* anti-GFAP-Cy3™ (1:500; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA; #C9205). O anticorpo secundário aplicado foi o *cabra* anti-*coelho* alexa 488 (#A11034). Todos os anticorpos secundários são policlonais e foram adquiridos da empresa Thermo Scientific (Rockford, IL, EUA). Experimentos independentes foram feitos para avaliar o efeito dos A $\beta$ Os sobre a expressão de TRPA1. Para isto, as células acima descritas foram tratadas com A $\beta$ Os<sub>40</sub> (10  $\mu$ M) ou A $\beta$ Os<sub>42</sub> (500 nM), ou os seus respectivos veículos, durante um período de 12 h, em estufa a 37 °C e, a marcação por imunocitoquímica procedeu exatamente como acima descrito para as células que

não receberam tratamento. Ou ainda, em um último protocolo, células neuronais foram tratadas com veículo (meio Neurobasal) ou ANI (1  $\mu$ M) – um inibidor da síntese proteica – por 1 h, em estufa a 37 °C e subsequentemente tratadas com VEIC ou A $\beta$ Os<sub>42</sub> (500 nM) durante um período de 12 h, em estufa a 37 °C. A fluorescência foi realizada exatamente como acima descrito para as células neuronais que não receberam tratamento. Em adição à captura das imagens, neste protocolo, as imagens capturadas foram quantificadas usando o programa Metamorph® (Molecular devices, Sunnyvale, CA, EUA), no qual os dendritos neuronais foram manualmente identificados utilizando a marcação para tubulina e a contagem de fluorescência para o TRPA1 foi realizada utilizando um *threshold*, ou limiar, de marcação positiva. Os dados foram obtidos em densidade óptica de fluorescência e expressos como porcentagem do controle, em unidades arbitrárias.

### *3.10.2 Avaliação da ligação dos A $\beta$ Os aos dendritos neuronais*

A células neuronais foram obtidas como descrito no item 3.3.3. Após, 15 DIV as células foram tratadas com FAM-A $\beta$ Os<sub>42</sub> (500 nM) ou VEIC por um período de 1 h, em estufa a 37 °C. A marcação fluorescente foi realizada utilizando o anticorpo primário policlonal *coelho* anti-TRPA1 (1:2000; Abcam, Cambridge, MA, EUA; #ab68847) e o secundário policlonal *cabra* anti-*camundongo* alexa 488 (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA; #A11001).

### 3.10.3 Efeito do HC030031 sobre a ligação dos A $\beta$ Os em dendritos neuronais

A células neuronais foram obtidas como descrito no item 3.3.3. Após, 15 DIV as células foram tratadas com VEIC ou com HC030031 (0,03  $\mu$ M) por 30 min e em seguida tratadas com A $\beta$ Os<sub>42</sub> (500 nM) ou VEIC por um período de 1 h, em estufa a 37 °C. A dupla fluorescência foi realizada utilizando os anticorpos primários monoclonal *camundongo* anti- $\beta$ tubulina III (1:2000; Promega, Madison, WI, EUA; #G721A) e monoclonal *camundongo* anti-A $\beta$ Os-alexa 568 NU4 (LAMBERT *et al.*, 2007), na concentração de 1,0  $\mu$ g/mL. O anticorpo secundário utilizado foi o policlonal *donkey* anti-*coelho* alexa 635 (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA; #A31576). As imagens foram analisadas e quantificadas usando o programa Metamorph® (Molecular devices), no qual os dendritos neuronais foram manualmente identificados e a contagem de fluorescência em *puncta* (característica da ligação de A $\beta$ Os às sinapses) foi realizada utilizando um limiar de marcação positiva. Os dados foram obtidos em densidade óptica de fluorescência e expressos como porcentagem do controle, em unidades arbitrárias.

## 3.11 Coleta do material biológico para as análises moleculares e bioquímicas

Para a realização das técnicas de imunoistoquímica e imunofluorescência, após o tratamento necessário para cada protocolo experimental, os animais foram anestesiados com uma solução composta por uma mistura de quetamina (50 mg/mL) e xilazina (2,5 mg/mL), administrada por via i.p. (100  $\mu$ L/10 g) e, em seguida,



realizada a perfusão transcardíaca com salina 0,9 % seguida de paraformaldeído (PFA 4 %). Os encéfalos foram coletados e fixados em solução de PFA 4 % por 24 h a 4 °C, e então crioprotetidos através da imersão em solução de sacarose 15 %, seguida de imersão em solução de sacarose 30 % a 4 °C. Secções coronais com espessura de 5 µm foram obtidas utilizando um criostato modelo Leica CM 1850 (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, EUA) LAMEB, CCB, da UFSC e fixadas à lamínulas de vidro tratadas com cobertura polarizada *Superfrost Excell®* (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA; #4941EXC), que foram armazenadas a -20 °C até o momento do uso. Ou ainda, foram obtidas secções sagitais com espessura de 50 µm utilizando um micrótomo congelante modelo Leica SM2000 R (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, EUA) do Departamento de Neurobiologia da *Northwestern University*, que foram armazenados em placas de cultura de 24 poços em solução PBS contendo sacarose 10 % e azida sódica 0,03 %, até o momento do uso. As amostras fatiadas com espessura de 5 µm foram imunomarcadas sobre as lâminas nas quais foram afixadas. Já as fatias de 50 µm foram imunomarcadas utilizando a técnica de *free floating*, e posteriormente, afixadas às lâminas no momento da montagem.

Para a realização dos experimentos de *western blotting*, os animais foram anestesiados em uma câmara saturada com isoflurano 2,5 %, após a administração dos tratamentos e/ou realização dos experimentos comportamentais. Os encéfalos foram removidos e lavados com solução salina (NaCl 0,9 %) resfriada à 4 °C e, imediatamente após, dissecados sobre uma placa de Petri sobreposta em gelo. A formação hipocampal, a porção frontal do córtex e o cerebelo foram retirados e depositados em microtubos plásticos e armazenados em

freezer à -80 °C, até o momento do preparo das amostras para a eletroforese e posterior imunodeteção.

### **3.12 Análises moleculares e bioquímicas *ex vivo***

#### **3.12.1 Imunofluorescência**

A técnica de imunofluorescência foi utilizada com diferentes finalidades: Avaliação da expressão de TRPA1; Dupla marcação para o TRPA1 e os AβOs; Tripla marcação para o TRPA1, os AβOs e a microglia; Dupla marcação para os AβOs e as placas amilóides. Todos os protocolos foram realizados nas fatias sagitais de 50 µm dos encéfalos de animais 5xFAD TG e controles, obtidas como descrito em 3.11, pela técnica de *free floating*. Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena (10 % metanol, 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em TBS) por 5 min, e em seguida, as fatias foram lavadas por três vezes de 5 min em TBS. As fatias foram então incubadas com solução de extração (0,3 % Triton X-100 em TBS) por três vezes de 10 min. A etapa seguinte consistiu no bloqueio das possíveis reações inespecíficas utilizando solução de bloqueio (10 % NGS, 0,3 % Triton X-100 em TBS), a temperatura ambiente por 40 min, sob leve agitação. Posteriormente, as fatias foram incubadas com os anticorpos primários de interesse para cada experimento, a temperatura de 2-8 °C, por 14-16 h. Após este período de incubação as fatias foram lavadas com TBS por três vezes de 10 min e incubadas com os anticorpos secundários fluorescentes apropriados para cada anticorpo primário utilizado, na concentração de 1:2000, todos da empresa Thermo Scientific (Rockford, IL, EUA), por 2 h em temperatura ambiente. Após a

incubação, as fatias foram lavadas em TBS por três vezes de 10 min e procedida a montagem das lamínas com meio Prolog Gold contendo DAPI (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA).

Os experimentos foram realizados no mínimo três vezes de maneira independente. As lâminas foram levadas para análise e aquisição de imagens em microscópio confocal fluorescente, modelo LEICA SP5 II *Laser Scanning* (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, EUA) localizado na *Biological Imaging Facility* (BIF) da *Northwestern University*, IL, EUA. A marcação de imunofluorescência foi avaliada em três diferentes sub-regiões do hipocampo dorsal: CA1, CA3 e GD, no córtex cerebral e no cerebelo. A aquisição das imagens foi realizada em uma magnificação de 400x, de no mínimo 2 fatias do mesmo animal e 3 animais por grupo.

#### 3.12.1.1 Avaliação da expressão de TRPA1

As fatias foram incubadas com anticorpo primário policlonal *coelho* anti-TRPA1 (1:2000; Abcam, Cambridge, MA, EUA; #ab68847), seguido de anticorpo secundário *cabra* anti-*coelho* alexa 488 (#A11034).

#### 3.12.1.2 Dupla marcação para TRPA1 e A $\beta$ Os

As fatias foram incubadas com os anticorpos primários policlonal *coelho* anti-TRPA1 (1:2000; Abcam, Cambridge, MA, EUA; #ab68847) e monoclonal *camundongo* anti-A $\beta$ Os-alexa 568 NU4 (1  $\mu$ g/mL). O anticorpo secundário aplicado foi o *cabra* anti-*coelho* alexa 488 (#A11034).

### 3.12.1.3 Tripla marcação para TRPA1, AβOs e microglia

As fatias foram incubadas com os anticorpos primários policlonal *coelho* anti-TRPA1 (1:2000; Abcam, Cambridge, MA, EUA; #ab68847), monoclonal *camundongo* anti-AβOs-alexa 568 NU4 (1 µg/mL) e policlonal *cabra* anti-Iba-1 (1:500; Abcam, Cambridge, MA, EUA; #ab5076). Os anticorpos secundários aplicados foram o *cabra* anti-*coelho* alexa 488 (#A11034) e o *donkey* anti-*cabra* alexa 633 (#A21082).

### 3.12.1.4 Detecção de AβOs seguida de contracoloração por Tioflavina-S

Este protocolo foi realizado em dois momentos diferentes, primeiro nas fatias sagitais de 50 µm dos encéfalos de animais 5xFAD TG e controles, com o intuito de distinguir os AβOs das placas fibrilares de Aβ. Após, nas fatias dos encéfalos de animais 5xFAD TG e controles que foram tratados por 60 dias com HC030031, a fim de verificar o efeito do tratamento com o antagonista TRPA1 sobre a formação/acúmulo das placas insolúveis de Aβ e AβOs. As fatias foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal *camundongo* anti-AβOs-alexa 568 NU4 (1 µg/mL). Após a incubação, as fatias foram lavadas com PBS por 5 vezes de 5 min. Em seguida, foi realizada a contracoloração com Thio-S. Para tanto, as fatias foram incubadas em uma solução de Thio-S 0,002 % em TBS-T (diluída de uma solução estoque de Thio-S 0,02 % em água destilada), por 10 min a temperatura ambiente. As fatias foram lavadas por 3 vezes, duração de 1 min, em etanol 50 % e outras 2 vezes em TBS-T por 5 min, e

depois seguidos os procedimentos de montagem descritos no item 3.10.1. A Thio-S é um corante amplamente utilizado para marcar placas amilóides fibrilares insolúveis, devido ao seu alto poder de interação com proteínas agregadas em formação  $\beta$ -folha, portanto muito seletiva para fibrilas e pouco seletiva para monômeros. Após a ligação nas estruturas  $\beta$ -folha, o corante emite fluorescência de espectro similar ao FITC.

### 3.12.2 Imunoistoquímica

A técnica de imunoistoquímica foi aplicada como descrito anteriormente (BICCA *et al.*, 2011), com a finalidade de avaliar a expressão do TRPA1 em fatias coronais de encéfalos de animais *Swiss* tratados com A $\beta$ Os<sub>40</sub>, em diferentes intervalos temporais: 6 h, 24 h, 8 dias e 15 dias após a injeção. As amostras foram obtidas e afixadas em lâminas como descrito no item 3.11. As lâminas foram deixadas a temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,5 % em metanol (v/v) por 20 min, e posterior lavagem em água destilada, com a finalidade de prevenir reações falso-positivas provenientes da revelação. Em seguida, as lâminas foram submersas em PBS contendo 1 % de BSA, durante 40 min a temperatura ambiente, sob leve agitação, com intuito de bloquear as possíveis reações inespecíficas. Posteriormente, foi incubado sobre os cortes teciduais a solução contendo o anticorpo policlonal *coelho* anti-TRPA1 (1:2000; Abcam, Cambridge, MA, EUA #ab68847) e as lâminas foram mantidas em câmara úmida a uma temperatura de 2-8 °C, durante 14-16 h. Após o período de incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas por três

vezes de 5 min cada com PBS a temperatura ambiente, e posteriormente incubadas com o anticorpo secundário biotinilado anti-coelho (1:250; Dako Cytomation, Glostrup, Copenhagen, Dinamarca; #E0432) em câmara úmida, durante 50 min a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com solução de peroxidase-estreptavidina-biotina (Dako Cytomation, Glostrup, Copenhagen, Dinamarca) por 40 min, em câmara úmida a temperatura ambiente. A etapa seguinte consistiu na lavagem das lâminas e incubação em uma solução cromógena (3,3'-diaminobenzidina 0,03 % e  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3 % em PBS). Posteriormente, foi realizada a contracoloração em solução de hematoxilina de Harris, diferenciação em água amoniacal 0,5 %, desidratação e diafanização das lâminas, seguida de montagem com meio Entellan (Merck, São Paulo, SP, Brasil).

A reação imunoistoquímica foi avaliada em três diferentes sub-regiões do hipocampo dorsal: CA1, CA3 e GD (giro denteado) e no córtex cerebral. As imagens dos cortes foram capturadas e digitalizadas com auxílio de uma câmera digital (Sight DS-5M-L1) acoplada a um microscópio ótico (Nikon, Melville, NY, EUA) situados no LAFEX, Departamento de Farmacologia, UFSC. As imagens foram capturadas em magnificação de 400x com precisão em cada sub-região do hipocampo e no córtex. Foram capturadas imagens de 2 diferentes cortes de cada animal, em 4 animais por grupo, todas no mesmo microscópio sob as mesmas configurações e mesma exposição a luz. A quantificação relativa da imunomarcção foi obtida através da análise de densitometria (densidade óptica) automática, utilizando o programa de imagens NIH ImageJ versão 1.40g (NIH, Bethesda, MD, EUA). Os resultados finais foram obtidos após a quantificação de 3 experimentos independentes. Os dados foram obtidos em densidade óptica de pixels

positivos e expressos como porcentagem do controle em unidades arbitrárias. Os dados gráficos representam os valores médios obtidos através da análise conjunta das imagens de CA1, CA3 e GD do hipocampo e do córtex.

### 3.12.3 *Western Blotting*

A técnica de *western blotting* foi aplicada em diferentes condições experimentais: utilizando amostras de A $\beta$ Os<sub>42</sub>, amostras de cultura celular primária tratada com A $\beta$ Os<sub>40</sub> e/ou A $\beta$ Os<sub>42</sub>, de tecido encefálico de camundongos *Swiss* administrados com A $\beta$ Os<sub>40</sub>, de camundongos 5xFAD TG, além de tecido encefálico de humanos portadores da DA, e os seus respectivos controles.

#### 3.12.3.1 Determinação dos oligômeros de A $\beta$ Os<sub>42</sub>

A preparação dos A $\beta$ Os<sub>42</sub> foi realizada como descrito no item 3.5.2. O protocolo de *western blotting* aqui realizado para avaliação das condições dos A $\beta$ Os<sub>42</sub> é idêntico ao utilizado para caracterização dos oligômeros. Neste procedimento experimental o objetivo de adotar este protocolo foi avaliar a possível interferência dos antagonistas e agonista TRPA1 sobre a formação e estabilização de oligômeros. Desta forma, as preparações de A $\beta$ Os foram centrifugadas e o sobrenadante coletado, para retirar as possíveis fibrilas formadas durante o período que os microtubos foram estocados a -4 °C. Em novos microtubos, a solução de A $\beta$ Os<sub>42</sub> foi diluída (meio Ham's F12) para atingir a concentração de 15  $\mu$ M. A cada tubo foi adicionado HC030031 (antagonista TRPA1), AP-18 (antagonista

TRPA1) ou CNH (agonista TRP1), todos na concentração de 10  $\mu$ M ou DMSO 0,1 % (veículo de diluição das drogas). Para cada tratamento foram feitos 3 tubos diferentes. Os microtubos foram colocados em um rotador e os compostos foram incubados por 1 h a temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação, foi acrescentado aos tubos o tampão de preparação de proteínas para corrida Laemmli (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, 25 %; glicerol 2 %, SDS 0,01 % e azul de bromofenol) 2x concentrado para posterior imunodeteção. O ensaio e imunodeteção foi realizado utilizando duplicata das amostras dos 3 diferentes tubos preparados para cada condição, bem como, uma amostra de A $\beta$ Os<sub>42</sub> que não passou por nenhum tratamento, e que foi o padrão de comparação.

### 3.12.3.2 Preparo do extrato celular total de células primárias e determinação de proteínas

As células primárias provenientes do hipocampo ou do córtex de ratos foram obtidas como descrito no item 3.3 e cultivadas em placas de 40 mm com os meios apropriados para cada tipo celular, durante no mínimo 15 DIV. As placas foram tratadas com A $\beta$ Os<sub>42</sub> (500 nM) ou A $\beta$ Os<sub>40</sub> (1  $\mu$ M), ou os seus respectivos veículos, por um período de 12 ou 24 h em estufa 37 °C. O próximo passo consistiu na remoção do meio de cultura das placas por aspiração e em seguida lavagem das células com 1 mL de meio HBSS aquecido, por duas vezes, sob movimentação suave. Após as lavagens, foi adicionado às placas solução contendo tampão de lise RIPA composto por Nonidet P-40 1 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), deoxicolato de sódio 0,5 %, SDS 0,1 % e PBS, acrescido de um mini tablete de inibidores de



proteases (Roche, San Francisco, CA, EUA; #05892970001) (50 µL). As células foram então raspadas para remoção da placa de cultivo, com o auxílio de uma espátula de plástico própria para este fim, e transferidas para microtubos identificados e mantidos no gelo. Decorridos 30 min, os microtubos foram centrifugados e o sobrenadante foi coletado para o posterior preparo das amostras. Em seguida, foi realizada a determinação de proteínas das amostras, utilizando o kit *BCA Protein assay* (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA#23225), conforme recomendações do fabricante. O sobrenadante de cada amostra foi diluído de modo a apresentar a mesma concentração de proteína, acrescidos em volumes iguais ao tampão de amostra Laemmli 5x concentrado contendo β-mercaptoetanol 15 %, e fervidas por 5 min, a temperatura de 100 °C. As amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C, até o momento da realização da imunodeteção.

### 3.12.3.3 Preparo do extrato celular total do tecido encefálico de camundongos e determinação de proteínas

Foram utilizados encéfalos de camundongos *Swiss* administrados com AβOs<sub>40</sub> ou VEIC e coletados após 6 h, 24 h, 8 dias e 15 dias da administração. Ainda, camundongos *Swiss* tratados i.c.v. com AβOs<sub>40</sub> ou com o VEIC e tratados por 14 dias, uma vez ao dia, por via oral com HC030031 (20 mg/kg) ou VEIC. Estes experimentos foram realizados na UFSC. Os encéfalos de camundongos 5xFAD TG e os seus respectivos controles foram coletados após as avaliações comportamentais realizadas nos animais, sendo que estes experimentos

foram realizados na *Northwestern University*. As amostras de tecido encefálico para a realização desta técnica foram obtidas como descrito anteriormente no item 3.11. As amostras de hipocampo, córtex e cerebelo foram homogeneizadas manualmente (com auxílio de micropistilos) utilizando tampão de lise RIPA acrescido de mini tabletes de inibidores de peptidases. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas em gelo por 30 min e, em seguida, centrifugadas (10.000 r.p.m., 4 °C, durante 10 min). O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado sob as mesmas condições. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi coletado, sendo este o extrato celular total contendo as proteínas dissolvidas no meio. Em seguida, foi realizada a determinação de proteínas das amostras. Para os experimentos realizados na UFSC, foi utilizado o equipamento NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 e a função Protein A280 do programa NanoDrop 1000 v3.7 (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA), para a determinação da quantidade de proteínas. Para os experimentos realizados na *Northwestern University* foi realizada a determinação de proteínas das amostras utilizando o kit BCA *Protein assay*, conforme recomendações do fabricante. Os extratos dos tecidos previamente preparados foram diluídos de modo a apresentar a mesma concentração de proteína, misturados em volumes iguais ao tampão de amostra Laemmli contendo  $\beta$ -mercaptoetanol 5x concentrado e fervidas por 5 min a 100 °C. As amostras foram armazenadas em freezer, a -20 °C, até o momento da realização da imunodeteção.

#### 3.12.3.4 Preparo do extrato celular total de tecido encefálico de humanos e determinação de proteínas

Os tecidos encefálicos humanos foram obtidos como descrito no item 3.4. As amostras foram retiradas do freezer até o completo descongelamento, e em seguida, foram acondicionadas em gelo. As amostras de córtex e cerebelo foram homogeneizadas manualmente (com auxílio de micropistilos) utilizando tampão de lise RIPA acrescido de mini tabletes de inibidores de peptidases. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas em gelo por 30 min e, em seguida, centrifugadas (10.000 r.p.m., 4°C, durante 10 min). Este procedimento foi realizado por 3 vezes. Após a terceira centrifugação, o sobrenadante foi coletado, sendo este o extrato celular total contendo as proteínas dissolvidas no meio. Em seguida, foi realizada a determinação de proteínas das amostras utilizando o kit BCA *Protein* assay, conforme recomendações do fabricante. Os extratos dos tecidos foram então diluídos de modo a apresentar a mesma concentração de proteína, misturados em volumes iguais ao tampão de amostra Laemmli contendo  $\beta$ -mercaptoetanol 5x concentrado, e fervidas por 5 min a 100 °C. As amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C, até o momento da realização da imunodeteção.

#### 3.12.3.5 Imunodeteção de proteínas por *Western blotting*

Para a realização dos ensaios de imunodeteção, todas as amostras foram mantidas em gelo até o completo descongelamento e centrifugadas por 1 min a

5000 r.p.m. Após, quantidades iguais de proteínas para cada amostra [A $\beta$ Os<sub>42</sub> (15 pmol), cultura de células primárias (15  $\mu$ g) e tecido encefálico de camundongos e humanos (30  $\mu$ g)], foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS (12-20 %). A etapa de transferência das proteínas contidas no gel para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA) foi realizada sob as seguintes condições: 100-120 V e 30 mA durante 1 h. Após a transferência, as membranas foram imersas em solução de TBS-T contendo BSA 5 % ou soro do animal no qual foi feito o anticorpo secundário 10 %, por no mínimo 1 h a 2-8 °C, com o objetivo de bloquear as reações inespecíficas. Após a lavagem em TBS-T (5 vezes, 5 min), as membranas foram incubadas durante 14-16 h (2-8 °C), com os anticorpos primários, diluídos em solução de bloqueio, contra as proteínas de interesse: policlonal *coelho* anti-TRPA1 (#ab68847) e policlonal *coelho* anti-IL-10 (#ab9969), ambos na concentração de 1:1000, da empresa Abcam (Cambridge, MA, EUA); monoclonal *camundongo* NU2 anti-A $\beta$ Os (1,5  $\mu$ g/mL); policlonal *coelho* anti-PSD-95 (#2507), monoclonal *coelho* anti-sinaptofisina (#5461), policlonal *coelho* anti-A $\beta$  (#2454), todos na concentração de 1:1000, da empresa Cell Signaling Tech. (Danvers, MA, EUA); policlonal *coelho* anti-NOS2 (#BS2072R), policlonal *coelho* anti-p-65-NF $\kappa$ B (#BS0465R), policlonal *coelho* anti-p-65-NF $\kappa$ B ser536 (#BS0982R) e policlonal *coelho* anti- $\beta$ -actina (#BS0061R), todos na concentração de 1:1000, da empresa BIOS (Woburn, MA, EUA). A próxima etapa consistiu na incubação dos anticorpos secundários conjugados à peroxidase, específicos para cada anticorpo primário: *cabra* anti-*rabitt*-HRP (1:25000, #7074) e *horse* anti-*camundongo*-HRP (1:25000, #7076), ambos da empresa Cell Signaling Tech.

(Danvers, MA, EUA), durante 2 h à temperatura ambiente. Os imunocomplexos foram visualizados usando sistema de detecção de substrato quimioluminescente, SuperSignal West Femto (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA; #34095) e expostos ao sistema de fotodocumentação ChemiDocTMXRS (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA) do LAMEB, do CCB, UFSC ou revelados utilizando uma estação de fotodocumentação KodaK 4400CF (KodaK, Rochester, NY, EUA) do laboratório de Neurobiologia da *Northwestern University*, campus Evanston, IL, EUA. As análises foram realizadas utilizando o programa NIH ImageJ 1.40g através da quantificação da densidade óptica. Os valores foram normalizados utilizando os valores obtidos para a  $\beta$ -actina, e expressos graficamente como porcentagem do controle.

#### 3.12.4 Sinaptossomas de córtex de ratos

Um sinaptossoma, por definição, é um terminal sináptico isolado de um neurônio. Na prática, foram obtidos por centrifugação diferencial de gradiente de densidade, que consiste na diferenciação do conteúdo celular através de ultracentrifugação. O potencial de membrana é mantido, bem como os receptores pré-sinápticos, o transporte de íons e as vesículas sinápticas contendo os neurotransmissores. Este sistema teste foi escolhido para a realização dos experimentos de coimunoprecipitação de proteínas e ensaio de ligação de A $\beta$ Os por *High Throughput Screening*.

### 3.12.4.1 Preparação dos sinaptossomas

O sinaptossomas de córtex de ratos foram preparados como descrito anteriormente (DODD *et al.*, 1981). Os ratos fêmeas foram submetidos a decapitação, e, em seguida, dissecação do córtex sob gelo. A seguir, o córtex foi colocado em um tubo de ensaio de vidro e foi adicionado um volume de 10 mL de uma solução gelada de sacarose (0,32 M, pH 7,0), seguida de homogeneização. A próxima etapa consistiu na centrifugação dos tubos utilizando uma centrifuga, de alta velocidade e refrigerada (0-4 °C), a 5100 r.p.m. por 10 min. Como resultado desta etapa de centrifugação, são obtidos um sedimento nuclear e um sobrenadante rico em outras estruturas do tecido. O sobrenadante (~ 8 mL) foi então coletado e transferido para um novo tubo de vidro contendo 4 mL de solução gelada de sacarose 1,2 M, novamente centrifugado, agora a 50.000 r.p.m. por 15 min. No sedimento resultante desta centrifugação encontra-se sinaptossomas, mielina e microssomas. Então o sedimento formado foi cuidadosamente coletado (~ 2 mL) e diluído em solução sacarose 0,32 M, em aproximadamente 7 mL. A suspensão formada foi distribuída em camadas em um volume de 4 mL de solução sacarose 0,8 M, em um novo tubo que foi centrifugado sob as mesmas condições da ultima centrifugação (50.000 r.p.m., 15 min). Três camadas de conteúdos diferentes resultaram desta centrifugação. Um sobrenadante superior em forma de suspensão com os microssomas, uma camada medial de interface um pouco mais densa contendo mielina, e uma camada inferior de um sedimento mais denso, com os sinaptossomas. Esta última camada foi cuidadosamente coletada e armazenada em alíquotas em microtubos à - 80 °C, até o momento da realização dos experimentos.

### 3.12.5 Coimunoprecipitação de proteínas

O ensaio de coimunoprecipitação foi empregado com o intuito de avaliar a possível interação dos A $\beta$ Os com o TRPA1. Esta técnica foi realizada como descrito anteriormente (WILCOX *et al.*, 2015), utilizando sinaptossomas do córtex de ratos obtidos como descrito no item 3.12.4.1. As alíquotas contendo sinaptossomas (2 mg) foram solubilizadas em 1 mL de meio gelado Ham's F12 sem vermelho de fenol, atingindo a concentração de 2 mg/mL. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 15 min a 6000 r.p.m. e temperatura de 4 °C, e os sedimentos formados ressuspensos e divididos em alíquotas, sendo diluídos em meio gelado Ham's F12, sem vermelho de fenol, para atingirem uma concentração de 0,5 mg/mL. Os tubos contendo os sinaptossomas foram incubados por 1 h a 37 °C com 300 nM A $\beta$ Os<sub>42</sub> ou com VEIC, em rotador. A próxima etapa consistiu em lavagem, que procedeu da seguinte forma, centrifugação (nas mesmas condições descritas anteriormente) e ressuspensão em meio novo gelado, seguida de suave agitação por 10 min a 4 °C, em rotador. Este procedimento de lavagem foi repetido 3 vezes. As amostras de sinaptossomas foram então ressuspensas em meio novo para atingir uma concentração de 1 mg/mL e incubadas por 1 h a 4 °C, em rotador, com monoclonal *camundongo* NU2 anti-A $\beta$ Os 2,5  $\mu$ g/mL ou *camundongo* IgG (controle negativo). Novamente as amostras passaram por 3 lavagens, como descrito no passo anterior, sendo que a última lavagem foi realizada com TBS gelado. Foi acrescentado aos tubos tampão de lise contendo Nonidet P-40 1 %, deoxicolato de sódio 0,5 %, SDS 0,1 %, Tris-HCl 50 mM e NaCl 150 mM (pH 8,0), que foi incubado por 30 min em gelo. A seguir, utilizamos *beads* magnéticos *cabra* anti-

*camundongo* IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA; #10033), que foram lavados com tampão de lise em rotador a 4 °C, com o objetivo de prepara-los para incubação com os sinaptossomas. Os sinaptossomas foram então incubados com os *beads* magnéticos por 14-16 h em rotador a 4 °C. Esta etapa visa a imunoprecipitação dos AβOs ligados à membrana dos sinaptossomas lisados, com os *beads* magnéticos. Após, ocorreram 3 lavagens dos tubos com tampão TBS gelado, o sobrenadante resultante da primeira lavagem foi guardado para utilização como controle de amostras não ligadas (NL). As amostras de sinaptossomas ligadas (L) e não-ligadas foram eluídas com solução SDS 0,1 % e tampão Laemmli 5x concentrado acrescido de DTT 1 M, e fervidas por 5 min a 100 °C. Por fim, 15 µg das amostras foram submetidas à imunodeteção como descrito no item 3.12.3.5. Os anticorpos utilizados nesta etapa foram o policlonal *coelho* anti-TRPA1 (1:1000; Abcam, Cambridge, MA, EUA; #ab68847), monoclonal *camundongo* NU2 anti-AβOs (1,5 µg/mL) e policlonal *coelho* anti-PSD-95 (1:1000; Cell Signaling Tech., Danvers, MA, EUA; #2507), seguidos dos anticorpos secundários conjugados à peroxidase *cabra* anti-*rabitt*-HRP (1:25000, #7074) ou *horse* anti-*camundongo*-HRP (1:25000, #7076), ambos da empresa Cell Signaling Tech. (Danvers, MA, EUA).

### 3.12.6 Ensaio de ligação de AβOs por *alpha screening*

O ensaio de ligação de AβOs por *alpha screening* foi realizado com o objetivo de investigar a possível ligação dos AβOs aos receptores TRPA1. Esta técnica foi realizada como descrito anteriormente (WILCOX *et al.*, 2015). Para tanto, foram desenvolvidos no laboratório



do Professor William Klein nanodiscos preparados com biblioteca de receptores sinápticos, provenientes de sinaptossomas, e um ensaio, por método similar ao de ELISA, específico para ligação de A $\beta$ Os à estes receptores.

### 3.12.6.1 Preparação dos nanodiscos

Nanodiscos são bicamadas fosfolipídicas em nanoescala que são formadas por auto-estabilização de proteínas de suporte de membranas (MSP; do inglês, *Membrane Scaffold Proteins*). Para promover a formação de nanodiscos contendo proteínas sinápticas, foram utilizados MSPs e palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC; do inglês; palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine) em excesso para obter um rendimento de uma proteína de membrana para 5 nanodiscos. POPC é um fosfolipídio sintético que é utilizado para formar os nanodiscos. POPCs solubilizados em clorofórmio foram secos sob uma corrente de gás nitrogênio (N<sub>2</sub>) para formar uma película uniforme em um tubo de ensaio de vidro, que foi armazenado sob vácuo durante 4 h para remover o solvente residual. Os POPCs secos foram ressuspensos em colato de sódio 100 mM, para atingirem uma concentração de 50 mM. Após, foram sonificados e agitados em vórtex e, sem seguida, incubados em água corrente aquecida, até que a solução se tornasse límpida. O próximo passo consistiu na adição de MSP1E3D1, uma proteína de suporte de membranas que permite a formação de nanodiscos. A razão MSP1E3D1:POPC foi de 1:130, e a solução foi então incubada por 2 h a 4 °C, sob suave agitação. As membranas provenientes de sinaptossomas de córtex de ratos foram obtidas como descrito no item 3.12.4.1, e

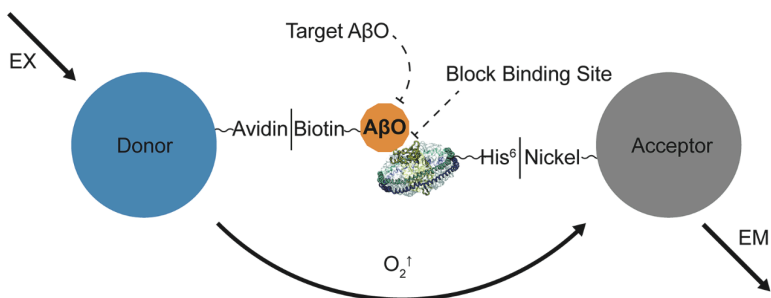
então solubilizadas em n-dodecil- $\beta$ -D-maltósido (D $\beta$ M) 1 % em uma concentração de 2 mg/mL e incubadas a 4 °C por 2 h, em rotador. A seguir, as membranas solubilizadas foram adicionadas à mistura MSP1E3D1/POPC e o volume final foi ajustado utilizando tampão Tris 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM e EDTA 0,5 mM, sendo que a concentração final de POPC foi de 5-20 mM, e de colato de sódio 12-40 mM. A adição das membranas de sinaptossomas aos nanodiscos favorece a criação de uma coleção de proteínas sinápticas em estado solúvel que apresentam ligação e ação enzimática íntegra. Estes nanodiscos são denominados bibliotecas de proteínas solúveis na membrana (SMPL; do inglês, Soluble Membrane Protein Library). Esta mistura de MSP1E3D1/POPC/membranas solubilizadas foi incubada a 4 °C por 2 h sob suave agitação. A auto-estabilização dos nanodiscos ocorreu durante 14-16 h e foi iniciada por remoção do detergente usando *beads* equilibrados com detergente Amberlite XAD-2 e água, que eram drenados e adicionados novamente a mistura até atingirem um volume correspondente a metade do volume final. Durante esta etapa os tubos foram mantidos sob agitação para manter os *beads* removedores de detergente em suspensão. Os *beads* removedores de detergente foram então filtrados da suspensão e o nanodiscos resultantes foram filtrados utilizando resina de agarose carregada com níquel (Ni-NTA). Os nanodiscos passaram ainda por diálise usando no mínimo 3 mL de PBS para remoção de imidazol, isto porque o imidazol interage com os braços de histidina dos nanodiscos, que são essenciais para o sucesso do experimento de ensaio de ligação. A concentração de proteínas totais foi realizada usando o kit *BCA Protein assay*, conforme recomendações do fabricante. Os nanodiscos foram rapidamente congelados em nitrogênio

líquido e armazenados a -80 °C, até o momento da realização dos experimentos.

### 3.12.6.2 Efeito do HC030031 sobre a ligação dos AβOs por ensaio de *alpha screening*

Um desenho esquemático simplificado do ensaio é mostrado na Figura 6. Todos os passos de ligação e lavagem foram realizados em PBS contendo BSA 0,1 % e imidazol 25 mM. Este tampão foi utilizado devido ao fato de prevenir a agregação dos *beads* utilizados no ensaio de *alpha screening*, e a ligação inespecífica. Os nanodiscos de teste (SMPL) ou os nanodiscos controles (POPC) foram diluídos em tubos para atingirem um concentração de 20 µg/mL e centrifugados de maneira breve. Em um local de luz baixa os *beads* aceptores quelados ao níquel foram adicionados aos tubos na concentração de 20 µg/mL e foram agitados por inversão. Em seguida, os tubos foram ligeiramente centrifugados e incubados por 1 h a temperatura ambiente, em rotador e cobertos por papel alumínio, para prevenir a exposição à luz. Os compostos utilizados para teste, incluindo os antagonistas do receptor TRPA1 – HC030031 e AP18 – e o agonista CNH, foram preparados na concentração estoque de 10 mM em DMSO. A inserção dos compostos nas placas de teste foi feita através de um sistema automatizado Echo550 *acoustic liquid handler* (Labcyte, Sunnyvale, CA, EUA), que foi usado para transferir 80 nL dos compostos, em duplicatas, à uma placa de fundo branco opaco contendo 384 poços. Os complexos formados entre nanodiscos e *beads* aceptores foram transferidos para uma placa de 96 poços de fundo cônico (45 µL) e outro sistema automatizado de pipetagem Multimek AP96 (Beckman

Coulter, Fullerton, CA, EUA) foi utilizado para transferir 10  $\mu\text{L}$  de cada poço para a placa de teste contendo os compostos. A placa foi selada com um alumínio adesivo e incubada por 1 h a temperatura ambiente, em um agitador de placas a 800 r.p.m. O próximo passo consistiu em diluir os A $\beta$ Os biotinizados em uma concentração de 400 nM e transferí-los para uma placa de 96 poços (25  $\mu\text{L}$ ), e pelo mesmo procedimento anterior fazer a pipetagem de 5  $\mu\text{L}$  de cada poço para a placa de teste, em uma concentração final de 100 nM. A placa de teste foi mais uma vez selada e incubada por 1 h, sob as mesmas condições descritas anteriormente. Por fim, foram adicionados à placa teste os *beads* doadores acoplados a estreptavidina, que foram diluídos a 80  $\mu\text{g/mL}$  e transferidas para a placa teste em 5  $\mu\text{L}$ , exatamente como descrito para os A $\beta$ Os. A placa mais uma vez foi incubada sob as mesmas condições anteriores, e o sinal luminescente foi medido em um leitor de placas de sinal luminescente EnSpire® multimode (Perkin-Elmer, Waltham, MA, EUA). A configuração utilizada foi excitação de 680 nm por 180 ms e emissão de 570 nm por 550 ms. Controles positivos (anti-A $\beta$ Os, anti-PrPc, anti-NMDA, entre outros) e controles negativos foram utilizados em cada ensaio para fins de validação e comparação. O ensaio foi realizado no mínimo 3 vezes de maneira independente, sendo que para cada composto foram realizadas 3 duplicatas de cada concentração (1,25; 6,25; 12,5; 25; 37,5 e 50  $\mu\text{M}$ ) em cada ensaio, além dos ensaios de screening iniciais, nos quais a concentração final de todos os compostos foi de 10  $\mu\text{M}$ .



**Figura 6. Desenho esquemático do ensaio de ligação de AβOs aos nanodiscos por alpha screening.** Os beads doadores possuem uma alça de avidina que tem afinidade pelos AβOs biotinalizados. Os AβOs ligam-se as proteínas sinápticas inseridas nos nanodiscos, que por sua vez, possuem uma alça de histidina. Os beads aceptores carregam uma molécula de níquel que possui afinidade pela histidina. Quando todas estas moléculas encontram-se interagindo, como apresentado no esquema, sob excitação ocorre a emissão de um sinal luminescente. Moléculas que interagem diretamente com os AβOs, ou que bloqueiam os receptores aos quais os AβOs se ligam, são capazes de perturbar o sistema, impedindo assim a emissão do sinal. (Retirado de WILCOX *et al.*, 2015)

### 3.12.7 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A técnica de MET foi utilizada com a finalidade de obter uma análise mais refinada, em nível estrutural celular, da quantidade e o tipo de densidades sinápticas no hipocampo de camundongos. Objetivamos determinar o efeito dos tratamentos sobre as sinapses.

### 3.12.7.1 Preparo das amostras

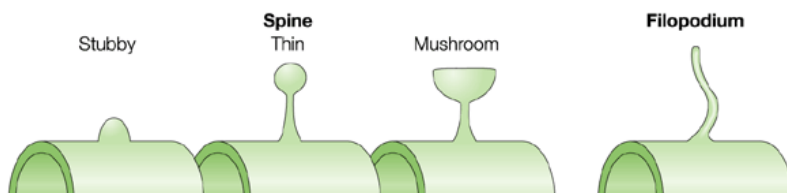
Os camundongos Swiss receberam injeção i.c.v. de A $\beta$ Os<sub>42</sub> ou com o VEIC. Decorridos 14 dias da injeção os tratamentos foram iniciados e duraram por 14 dias. Uma vez ao dia foi administrado HC030031 (20 mg/kg) ou o VEIC, por via oral. Ao fim do tratamento os animais foram submetidos ao teste do RO. Após o período experimental, as amostras de encéfalo foram coletadas e processadas para análises através de MET, com base em metodologia previamente descrita (SIMIONI *et al.*, 2014), com adaptações discretas para o uso em tecido animal. Os animais foram anestesiados com uma solução composta por uma mistura de quetamina (50 mg/mL) e xilazina (2,5 mg/mL), administrada por via i.p. (100  $\mu$ l/ 10 g) e, em seguida, realizada a perfusão transcardíaca com salina 0,9 % seguida de solução de fixação (glutaraldeído 2,5 %, PFA 4 % e sacarose 2 % em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,2). Os encéfalos foram coletados e os hipocampus dissecados e transferidos para microtubos contendo solução de fixação, permanecendo nesta solução por 12 h a temperatura de 4 °C. Em seguida, foram realizadas 3 imersões, com duração de 10 min, em tampão cacodilato de sódio contendo concentrações decrescentes de sacarose. O próximo passo consistiu em pós-fixação em tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) 1 % em tampão cacodilato de sódio, durante 2 h a temperatura ambiente. Na sequência as amostras passaram por 3 lavagens, de 10 minutos cada, em tampão cacodilato de sódio. Após as lavagens, as amostras foram desidratadas em uma série acetônica crescente (30 , 50 , 70 , 90 e 100 %), com duração de 15 minutos cada etapa. A última acetona (100 %) foi trocada duas vezes. O material foi então infiltrado com resina Spurr em séries graduais de

acetona/resina Spurr, durante três dias, seguido de duas infiltrações em resina pura por 12 h, e polimerização em estufa a 70 °C por 24 h. As secções ultrafinas (0,6 µm) foram realizadas com navalha de diamante em ultramicrotomo modelo LEICA EM UC7 (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, EUA) localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), da UFSC e, posteriormente, contrastados com acetato de uranila 1 % e citrato de chumbo 1 %. As secções foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão modelo JEM 1011 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) localizado no LCME da UFSC, utilizando a configuração de 80 kV em magnificação de 20.000x e 40.000x.

### 3.12.7.2 Análise de terminações sinápticas por MET

A análise de terminações sinápticas foi realizada nas fotomicrografias obtidas por MET baseando-se em uma metodologia descrita anteriormente (HONGPAISAN; SUN; ALKON, 2011). Os resultados foram obtidos utilizando 3 amostras de animais por grupo, sendo que foram adquiridas fotos de 4 fatias diferentes de cada animal e, para cada fatia, 5 quadrantes distintos. Espinhas dendríticas foram definidas como as estruturas que não continham mitocôndrias e que formavam sinapses com o terminal axonal (contendo mitocôndrias). A quantificação foi feita utilizando como parâmetro as espinhas dendríticas em formato de cogumelo (do inglês; *mushroom spines*). Um dendrito pode conter diversas espinhas dendríticas em formatos diferentes (Fig 7). A classificação das espinhas dendríticas em formato de cogumelo seguiu o seguinte parâmetro: A cabeça (do

inglês; *spine head*) das espinhas exibindo tamanho maior que 600 nm claramente conectadas, ou não, ao pescoço (do inglês; *spine neck*). Todas as medições e contagens foram realizadas utilizando o programa NIH ImageJ 1.40g.



**Figura 7. Desenho esquemático das diferentes espinhas dendríticas.** As espinhas dendríticas podem ser classificadas em *stubby*, que não possuem pescoço (do inglês, *spine neck*); *thin*, que possuem um pescoço evidente e cabeça (do inglês, *spine head*) arredondada; *mushroom*, que possuem pescoço e apresentam a cabeça em formato de um cogumelo; ou ainda, *filopodium*, que apresentam-se como um fino prolongamento, sem a cabeça evidente.

### 3.13 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad® versão 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Os resultados experimentais foram expressos como média + E.P.M ou a mediana e intervalos interquartis, conforme a normalidade de distribuição das amostras de cada experimento. Neste trabalho cada resultado recebeu a análise estatística necessária condizente com o tipo de teste e variáveis importantes. Foram empregados o teste *t Student* não-pareado, a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo post-hoc de *Newman-Keuls* ou *Dunnett*, ou



ainda, para os dados não-paramétricos o teste pareado de *Wilcoxon*. A especificação dos testes estatísticos empregados em cada experimento, bem como o número de animais, amostras e repetições, está indicada nas legendas de cada figura. O nível de significância adotado para todas as análises foi de  $p \leq 0,05$ .

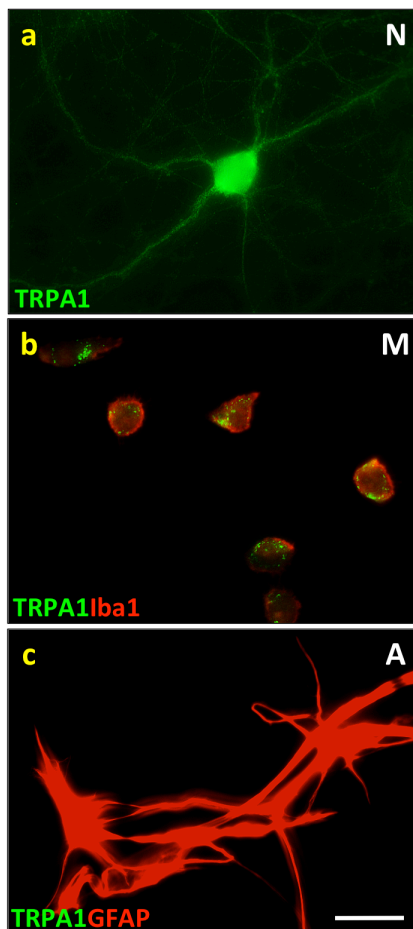


## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Avaliação da expressão do receptor TRPA1 no encéfalo**

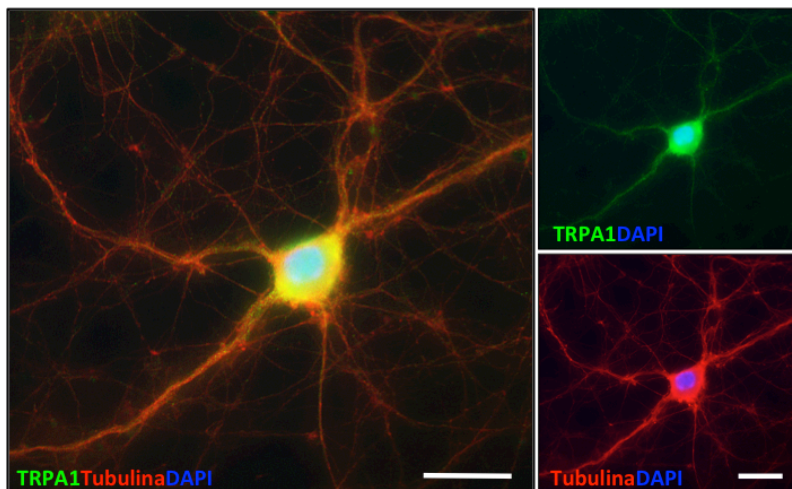
Determinar a expressão do receptor TRPA1 no encéfalo foi a primeira e crucial etapa para a realização deste trabalho. A hipótese de que este receptor participa da toxicidade relacionada ao peptídeo A $\beta$ , é completamente dependente da sua presença em regiões encefálicas responsáveis pelo processamento e armazenamento da memória. Ademais, quais seriam os tipos celulares que estariam expressando este receptor constitutivamente? Assim, nosso primeiro questionamento foi em relação à presença do receptor TRPA1 em células neuronais e astrogliais. Para responder esta pergunta, avaliamos através da técnica de imunocitoquímica, a expressão de TRPA1 em células de cultivo primário neuronais, microgliais e astrocitárias, provenientes do hipocampo e córtex de ratos.

A Figura 8 apresenta um painel de fotos representativas dos diferentes tipos celulares após a realização da imunodeteção de TRPA1. Em todos os tipos celulares a fluorescência verde é indicativa de reação positiva para o TRPA1. É possível observar no painel superior (Fig. 8a) que neurônios expressam o receptor TRPA1 constitutivamente, tanto no corpo celular quanto nos neuritos. Não somente os neurônios, mas também as células microgliais expressam TRPA1 (Fig. 8b). Surpreendentemente, a ausência de fluorescência verde nas células astrocitárias (Fig. 8c) destacou-se nestes primeiros resultados analisados, sugerindo que o receptor TRPA1 não se encontra expresso constitutivamente nestas células encefálicas.



**Figura 8. Expressão do receptor TRPA1 em diferentes tipos celulares encefálicos.** A cultura primária das células foi realizada a partir do hipocampo e do córtex de embriões de ratos (E18) e os ensaios de imunocitoquímica foram realizados após 21 DIV. Imagens representativas da imunoreatividade para o TRPA1 em (a) neurônios = N, (b) microglias = M e (c) astrócitos = A. Iba-1, marcador para microglias; GFAP, marcador para astrócitos. Foram realizados 5 ensaios independentes em triplicata para cada tipo celular. As imagens para análise foram capturadas de 5 diferentes campos para cada repetição utilizando microscópio invertido epifluorescente, em um aumento de 600x. Escala= 25 µm.

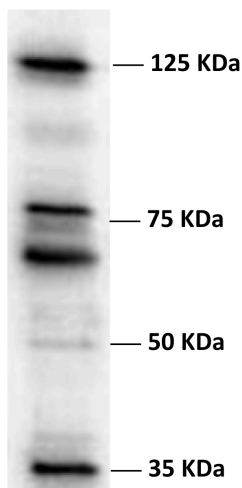
O marcador de células microglias Iba-1 foi utilizado como sinalizador para as células microgлияis e para as células astrocitárias foi utilizado o marcador GFAP; ambos evidenciados na fluorescência vermelha. Além disso, utilizamos um marcador neuronal para as amostras de cultura primária de neurônios, como pode ser observado na Figura 9, o marcador  $\beta$ III-tubulina em fluorescência vermelha, destacando os neuritos. O TRPA1, em verde, está aparentemente presente em alguns dos dendritos neuronais, mas não em sua totalidade. Esta análise fica mais evidente quando examinamos a colocalização entre os dois marcadores, que tem como resultante uma cor amarela. O marcador DAPI (azul) foi empregado para distinguir o núcleo das células.



**Figura 9. Expressão do receptor TRPA1 em células neuronais.** A cultura primária de neurônios hipocâmpais foi realizada a partir de embriões de ratos (E18) e os ensaios de imunocitoquímica foram realizados após 21 DIV. Imagens representativas da imunomarcação para o TRPA1 (verde),  $\beta$ III-tubulina (vermelho) e DAPI (azul; marcador nuclear). Foram realizados 3 ensaios independentes em triplicata. As imagens para análise foram capturadas de 5 diferentes campos para cada repetição utilizando microscópio invertido epifluorescente, em um aumento de 600x. Escala= 25  $\mu$ m.

O neurônio possui uma estrutura celular complexa tanto no sentido anatômico, quanto no sentido funcional. A pergunta seguinte versou sobre a presença do receptor TRPA1, especificamente nas sinapses, visto que através da técnica de imunocitoquímica foi possível observar a expressão de TRPA1 em estruturas dendríticas, mas apenas com esta análise não se poderia afirmar conclusivamente, se o receptor estaria compondo uma sinapse, em uma espinha dendrítica, ou não. Tendo em vista que um sinaptossoma nada mais é

que um terminal sináptico isolado de um neurônio, obtido por meio de ultracentrifugação diferencial, sinaptossomas de córtex de ratos foram utilizados e analisados através da imunodeteção por *western blotting*. Neste contexto, a Figura 10 ilustra os resultados encontrados, revelando 4 bandas majoritárias e outras duas minoritárias para o TRPA1 nos sinaptossomas (Fig. 10). A banda preditiva para o receptor TRPA1 é de 125 kDa. Além desta, duas bandas em torno de 75 kDa e uma outra de 35 kDa, formaram as bandas majoritárias. As bandas minoritárias foram de aproximadamente 30 kDa e uma outra de 50 kDa. Este resultado evidenciou o TRPA1 como constituinte dos terminais sinápticos neuronais.



**Figura 10. Expressão do receptor TRPA1 em sinaptossomas.** Imagem representativa de um ensaio de *western blotting* para imunodeteção de TRPA1 em sinaptossomas do córtex de ratos. O TRPA1 apresenta quatro principais bandas incluindo a mais alta de 125 KDa e outras como ~ 75 KDa, 50 KDa e 35 KDa. Foram realizados 2 experimentos independentes em duplicata.

O resumo dos resultados deste primeiro bloco de experimentos é apresentado de maneira simplificada e esquemática na Tabela 1.



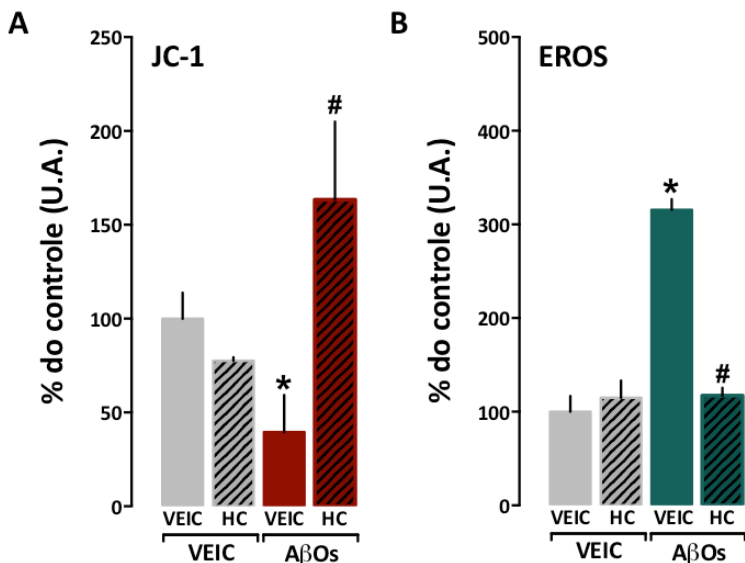
Tabela 1. Sumário dos resultados relacionados à expressão do receptor TRPA1 no encéfalo

Sumário de resultados - 1	
Descrição	Resultado
Expressão do TRPA1 nas células neuronais	✓
Expressão do TRPA1 em sinaptossomas	✓
Expressão do TRPA1 nas células microgliais	✓
Expressão do TRPA1 nas células astrocitárias	✗

✓ = SIM ✗ = NÃO

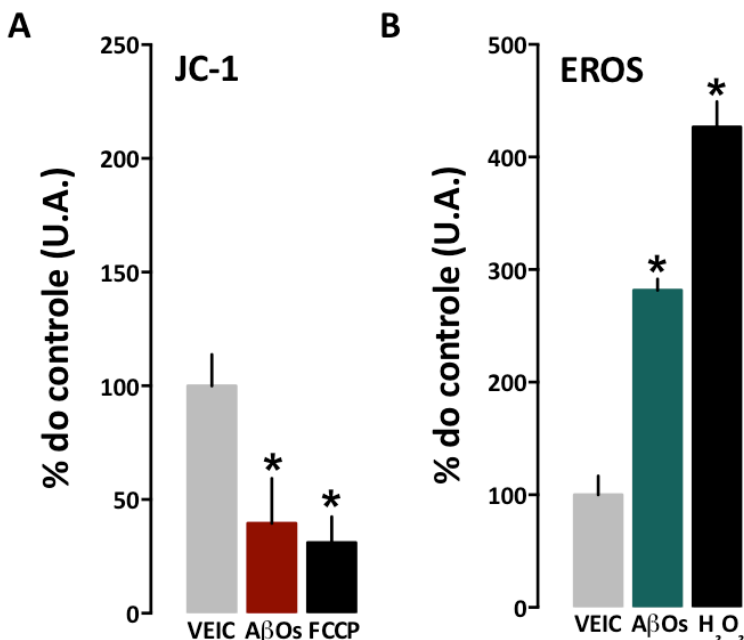
## 4.2 A participação do receptor TRPA1 na toxicidade induzida por A $\beta$ Os

Após a evidência acerca da expressão do receptor TRPA1 em células neuronais e microgliais, em regiões importantes como o córtex e o hipocampo, decidimos testar a hipótese de que o TRPA1 participaria da indução na toxicidade neuronal por A $\beta$ Os. Utilizando ainda as culturas primárias neuronais, analisamos a capacidade de um antagonista do TRPA1, o HC030031, de bloquear os efeitos deletérios induzidos pelos A $\beta$ Os. Antes de iniciar os tratamentos com o antagonista, foram realizadas curvas concentração-resposta *in vitro*, para avaliar a toxicidade neuronal do composto HC030031 (dados não mostrados). As concentrações foram estimadas por cálculos e extrapolação de dados prévios *in vivo*, do nosso grupo de pesquisa (DA COSTA *et al.*, 2010), uma vez que não haviam relatos na literatura, até aquele momento, da utilização deste composto *in vitro*. A Figura 11 exibe os gráficos obtidos a partir da análise do potencial de membrana mitocondrial (PMM) e de espécies reativas de oxigênio (EROS) por fluorescência, utilizando as sondas JC-1 e H<sub>2</sub>DCFH-DA, respectivamente. É notável a habilidade dos A $\beta$ Os<sub>42</sub> de induzir diminuição do PMM (Fig. 11A), um indício de colapso mitocondrial, e ainda a capacidade dos A $\beta$ Os<sub>40</sub> de induzir um aumento significativo na formação de EROS (Fig. 11B).



**Figura 11. Avaliação da participação do receptor TRPA1 na toxicidade induzida por AβOs.** As células neuronais de cultura primária de hipocampo (17 DIV) foram tratadas com VEIC ou HC030031 (HC; 0,03 μM) por 30 min antes da incubação com (A) VEIC ou AβOs<sub>42</sub> (500 nM) para a avaliação do PMM, ou com (B) VEIC ou AβOs<sub>40</sub> (1 μM) para a avaliação de EROS. Após o tempo de tratamento, as células foram incubadas com a sonda JC-1 (1 μl/mL) ou H<sub>2</sub>DCFH-DA (1 μM), respectivamente. VEIC= veículo; HC= HC030031, antagonista TRPA1. Foram realizados 2 experimentos independentes em quintuplicata para cada condição. Os gráficos apresentam a média + E.P.M da intensidade de fluorescência, expressos como porcentagem do grupo controle (VEIC/VEIC). \**p* ≤ 0,05 comparado ao grupo veículo; #*p* ≤ 0,05 comparado ao grupo AβOs. U.A.= unidades arbitrárias. ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* Newman-Keuls.

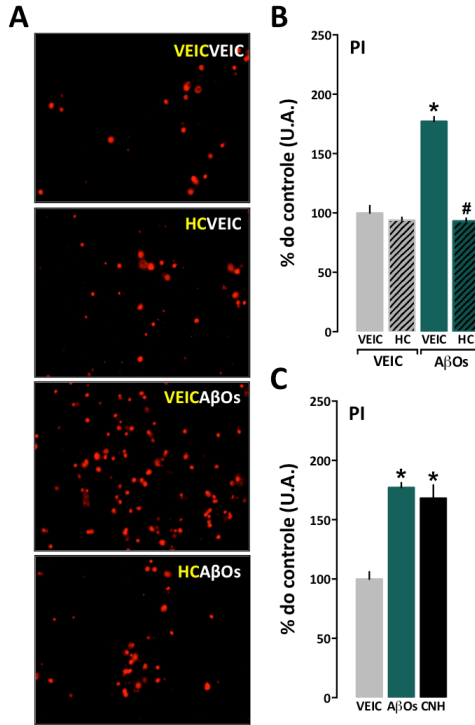
Este achado torna-se ainda mais evidente quando observamos o gráfico de comparação dos efeitos dos A $\beta$ Os<sub>42</sub> e A $\beta$ Os<sub>40</sub> com os respectivos controles positivos apropriados para cada teste, sendo estes o FCCP (Fig. 12A) e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 12B). Em conjunto, estes resultados são um indicativo de estresse oxidativo celular induzido pelos A $\beta$ Os. Os gráficos da Figura 11 revelam ainda que o antagonista do receptor TRPA1, o HC030031, na concentração de 0,03  $\mu$ M preveniu tanto a redução do PMM quanto a formação de EROS induzidas pelos A $\beta$ Os. Estes resultados sugerem, portanto, que a ativação de TRPA1 parece ser necessária para a indução do estresse oxidativo neuronal induzido por A $\beta$ Os.



**Figura 12. Comparação entre a toxicidade induzida por AβOs e os controles positivos dos ensaios.** As células neuronais de cultura primária de hipocampo (17 DIV) foram tratadas com (A) VEIC, AβOs<sub>42</sub> (500 nM) e FCCP (10 mM), 1 h antes da incubação com a sonda JC-1 (1 µl/ml) ou (B) com VEIC, AβOs<sub>40</sub> (1 µM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM), 40 min antes da sonda H<sub>2</sub>DCFH-DA. VEIC= veículo; FCCP, controle positivo de dano mitocondrial; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, controle positivo de EROS. Os gráficos apresentam a média + E.P.M da intensidade de fluorescência, expressos como porcentagem do grupo controle (VEIC). \**p* ≤ 0,05 comparado ao grupo veículo. U.A.= unidades arbitrárias. ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* Newman-Keuls

Outra indicação de que o TRPA1 seria importante para a indução da toxicidade pelos AβOs, foi evidenciada quando avaliamos a capacidade do HC030031 de impedir a morte neuronal. As imagens representativas da marcação por iodeto de propídeo (PI) mostram

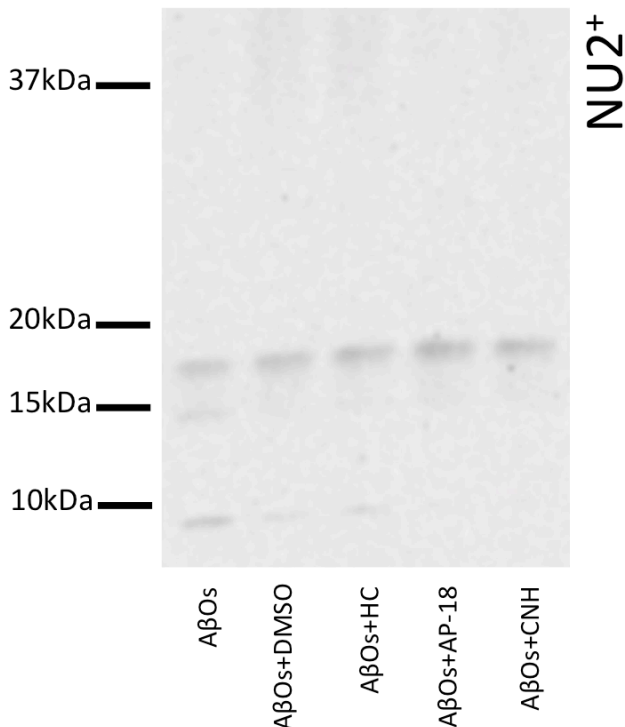
expressivo aumento de fluorescência nas células que receberam A $\beta$ Os<sub>40</sub> (Fig. 13A). Esta diferença torna-se clara quando observamos o gráfico da quantificação de fluorescência emitida (Fig. 13B), que demonstra aumento significativo da incorporação de PI nas células expostas aos A $\beta$ Os<sub>40</sub>. Ademais, quando comparamos os efeitos causados pelos A $\beta$ Os, com aqueles causados por um agonista do TRPA1, o cinamaldeído (CNH), observamos que ambos causaram toxicidade (Fig. 13C). Estes achados ressaltam o papel da ativação do TRPA1 para indução da toxicidade neuronal, decorrente de um possível desequilíbrio oxidativo, que é acarretado pelos A $\beta$ Os.



**Figura 13. Avaliação da participação do receptor TRPA1 na morte neuronal induzida por AβOs.** As células neuronais de cultura primária de hipocampo (17 DIV) foram tratadas com VEIC ou HC030031 (HC; 0,03  $\mu$ M) por 30 min antes da incubação com VEIC ou AβOs<sub>40</sub> (1  $\mu$ M) durante 24 h. Após o tempo de tratamento, as células foram incubadas com solução de PI (1  $\mu$ M). **(A)** Imagens representativas da incorporação de PI (vermelho fluorescente). **(B)** Representação gráfica da intensidade de fluorescência do PI. **(C)** Representação gráfica da intensidade de fluorescência do PI para as células que foram tratadas com VEIC, AβOs<sub>40</sub> (1  $\mu$ M) ou CNH (0,03  $\mu$ M) 3-4 h antes da solução de PI (1  $\mu$ M). VEIC= veículo; HC= HC030031, antagonista TRPA1; CNH= cinamaldeído, agonista TRPA1. Os dados representam 2 experimentos independentes realizados em quintuplicata. Os gráficos apresentam a média + E.P.M da intensidade de fluorescência, expressos como porcentagem do grupo controle (VEIC/VEIC ou VEIC). \* $p \leq 0,05$  comparado ao grupo controle; # $p \leq 0,05$  comparado ao grupo AβOs. U.A.= unidades arbitrárias. ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* Newman-Keuls.

Na tentativa de esclarecer se o efeito benéfico do HC030031 – que foi observado nos três diferentes ensaios de toxicidade *in vitro* – poderia ser resultado da interação direta do antagonista com os AβOs, e não devido ao bloqueio dos receptores TRPA1, decidimos realizar um experimento adicional. Os AβOs<sub>42</sub> foram incubados durante 1 h com o HC030031. Adicionalmente, neste teste foram também incluídos o AP-18, outro antagonista do receptor TRPA1, e o CNH, agonista do receptor TRPA1. Os controles para o teste incluíram os AβOs sem nenhum tratamento, e os AβOs incubados com DMSO, o veículo utilizado para a diluição de todos os compostos. Após a incubação, os AβOs passaram por ensaio de *western blotting* utilizando anticorpo NU2 contra os AβOs. A Figura 14 mostra a foto representativa de um dos ensaios realizados. Usualmente, o resultado de uma marcação com NU2 revela bandas majoritárias em 13 e 17 kDa, que se referem aos trímeros e tetrâmeros de Aβ, respectivamente. Ainda, uma mancha mais escura acima de 37 kDa, que se refere aos oligômeros maiores, e uma banda abaixo de 10 kDa que se refere aos monômeros de Aβ. Este padrão é observado na primeira linha da corrida eletroforética (Fig. 14 “AβOs”). Pode-se notar também que a incubação com HC030031 parece promover modificações sutis na formação de trímeros, porém, o mesmo padrão foi observado quando os AβOs foram incubados somente com DMSO, indicando que a provável alteração é atribuída ao solvente utilizado, e não ao composto. Por fim, o perfil de marcação obtido com AP-18 e CNH, em comparação ao obtido apenas com DMSO, sugere que estes compostos interferem com a estabilização de monômeros, formação de trímeros e oligômeros maiores.





**Figura 14. Efeito dos diferentes compostos sobre a formação e/ou estabilização dos A $\beta$ Os.** Imagem representativa da técnica de *western blotting* utilizando anticorpo NU2 para detecção de A $\beta$ Os. As amostras de A $\beta$ Os foram incubadas com: DMSO= dimetilsulfóxido (0,1 %), HC= HC030031, antagonista TRPA1 (10  $\mu$ M); AP-18, antagonista TRPA1 (10  $\mu$ M); CNH= cinamaldeído, agonista TRPA1 (10  $\mu$ M). O dado apresentado é representativo de 1 dos 3 experimentos independentes realizados em duplicata para cada condição. Oligômeros maiores= >37 kDa; Tetrâmeros= 17 kDa; trímeros= 13 kDa; monômeros e dímeros= <10 kDa.

O resumo dos resultados deste bloco de experimentos está simplificado na Tabela 2.

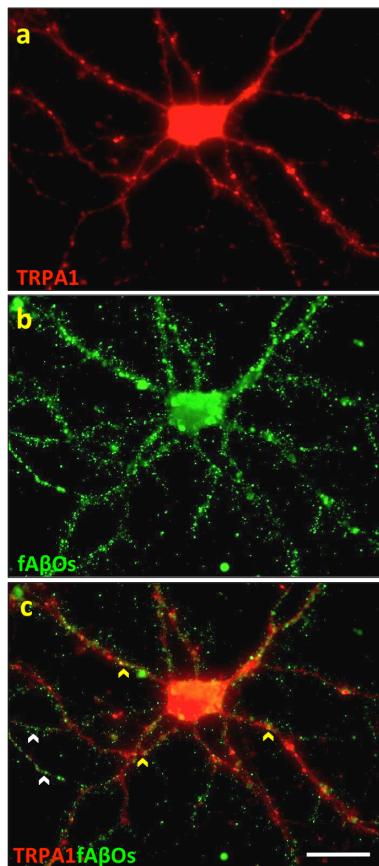
**Tabela 2. Sumário dos resultados relacionados à toxicidade neuronal induzida por AβOs**

Sumário de resultados - 2	
Descrição	Resultado
Efeito do HCO30031 sobre a perturbação do PMM induzida por AβOs <sub>42</sub>	↓
Efeito do HCO30031 sobre a formação de EROS induzida por AβOs <sub>40</sub>	↓
Efeito do Cinamaldeído sobre a morte neuronal	↕
Efeito do HCO30031 sobre a morte neuronal induzida por AβOs <sub>40</sub>	↓
Efeito do HCO30031 sobre a formação e/ou estabilização de AβOs <sub>42</sub>	✗

↓ = DIMINUI    ↕ = AUMENTA    ✗ = NÃO

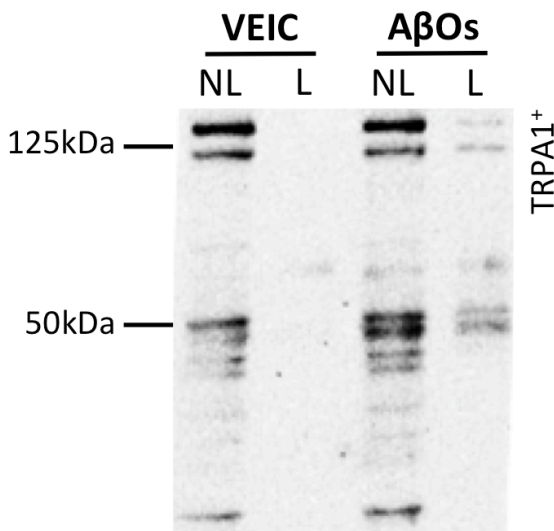
### 4.3 O envolvimento do receptor TRPA1 na ligação dos A $\beta$ Os às sinapses

Após observar o efeito benéfico do bloqueio dos receptores TRPA1 frente aos A $\beta$ Os, e ainda, interpretar que este efeito aparentemente não se devia à interação direta do antagonista com estes oligômeros, nossa próxima pergunta envolveu a possível interação entre TRPA1 e A $\beta$ Os. Neste sentido, a próxima hipótese seria de que o TRPA1 poderia atuar como um receptor direto para os A $\beta$ Os. Para validar esta ideia, uma série de diferentes experimentos foi cuidadosamente desenhada e realizada. A Figura 15, mostra em cultura primária de neurônios, a ligação dos A $\beta$ Os<sub>42</sub> aos dendritos neuronais marcados com anticorpo anti-TRPA1. Pode-se observar através da fluorescência vermelha a distribuição de TRPA1 nos neurônios (Fig. 15a). Os A $\beta$ Os fluorescentes (fA $\beta$ Os; verde) aparecem ligados aos dendritos neuronais em *puncta*, como se fossem pequenas esferas na superfície dos neurônios, uma ligação característica destes oligômeros (Fig. 15b). A sobreposição das imagens (Fig. 15c) revela alguns fatores importantes. Há colocalização entre TRPA1 e os A $\beta$ Os, que fica evidente pela cor amarela – resultante da sobreposição de verde e vermelho – e que é, em alguns pontos, exemplificada pelas setas amarelas. Ademais, alguns dendritos TRPA1 positivos (vermelhos) não apresentam A $\beta$ Os ligados, enquanto que, dendritos TRPA1 negativos aparecem cobertos por A $\beta$ Os, como sinalizado pelas setas brancas (Fig. 15c). A análise quantitativa feita através do programa Metamorph® indicou uma porcentagem de colocalização de 50-60 % (dados não mostrados) entre TRPA1 e A $\beta$ Os. Considerando estes dados, podemos inferir que o receptor TRPA1 contribui, ao menos em parte, para a ligação dos A $\beta$ Os aos dendritos neuronais.

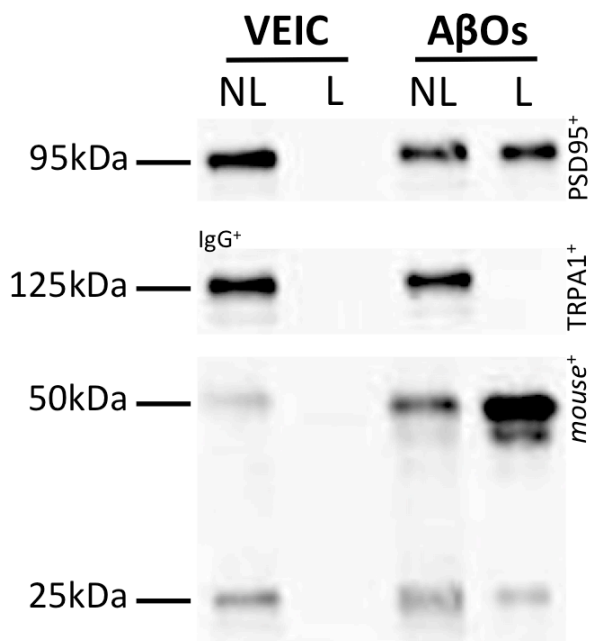


**Figura 15. A ligação de AβOs em cultura celular de neurônios que expressam o receptor TRPA1.** O ensaio de imunocitoquímica foi realizado em cultura primária de neurônios hipocampais (21 DIV), que foram tratados com veículo ou fAβOs<sub>42</sub> (500 nM), durante um período de 12 h. As imagens são representativas da imunomarcagem para (a) TRPA1 (vermelho) e (b) AβOs fluorescentes (fAβOs, verde), em células neuronais. (c) Sobreposição das imagens apresentando a colocalização (amarelo). Setas amarelas, exemplificam pontos de colocalização; setas brancas, indicam fAβOs não colocalizados com TRPA1. fAβOs = FAM-AβOs. Foram realizados 2 ensaios independentes em triplicata. As imagens para análise foram capturadas de 5 diferentes campos para cada repetição utilizando microscópio invertido epifluorescente, em um aumento de 600x. Escala= 25 μm.

Em seguida, testamos a habilidade dos A $\beta$ Os em se ligar ao receptor TRPA1 através de ensaio de coimunoprecipitação de proteínas. Para a realização deste ensaio, foram utilizadas sinaptossomas do córtex de ratos. A Figura 16 mostra as bandas proteicas obtidas por fotodocumentação, após a realização da técnica de *western blotting*. É possível notar que havia TRPA1 ligado aos A $\beta$ Os, uma vez que as bandas de 125 kDa e 50 kDa foram observadas apenas nas amostras tratadas com A $\beta$ Os e não naquelas tratadas com veículo (VEIC) (Fig. 16 “L”). Ainda, havia TRPA1 remanescente nas amostras que não se ligaram aos A $\beta$ Os (Fig. 16 “NL”). Os devidos controles positivos e negativos foram realizados para este ensaio. Na Figura 17 estão as fotos representativas da mesma membrana que passou por ensaio de imunodeteção para PSD95 (controle positivo), uma proteína que reconhecidamente se liga aos A $\beta$ Os, exibindo uma banda característica em 95 kDa, para as amostras tratadas com os A $\beta$ Os (Fig. 17 “L”). Ademais, amostras tratadas com IgG em lugar do anticorpo NU2 anti-A $\beta$ Os (controle negativo) não apresentam nenhuma marcação para TRPA1, sugerindo a especificidade do ensaio. Por fim, imunodeteção utilizando anti-*camundongo* para confirmar a presença dos A $\beta$ Os e dos anticorpos NU2 nas amostras (Fig. 17 “L”). Este conjunto de resultados indica que há ligação entre A $\beta$ Os e TRPA1 nas sinapses.



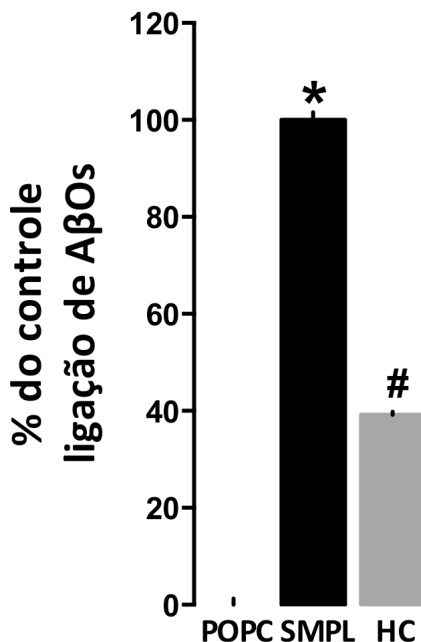
**Figura 16. Ensaio de coimunoprecipitação entre o receptor *TRPA1* e os AβOs.** Imagem representativa das bandas obtidas por *western blotting* no ensaio de coimunoprecipitação. Os sinaptosomas do córtex de ratos foram tratados com veículo (VEIC) ou AβOs<sub>42</sub> (300 nM) e as proteínas da membrana foram sinalizadas com anticorpo *camundongo* NU2 anti-AβOs, e subtraídas com *beads* magnéticos anti-*camundongo* IgG, finalmente, o imunoprecipitado foi revelado com anti-TRPA1. NL= fração eluída do material não-ligado; L= fração eluída do material ligado. Foram realizados 2 experimentos independentes em duplicata.



**Figura 17. Controles realizados para os ensaios de coimunoprecipitação.** Imagens representativas das bandas obtidas por *western blotting* nos ensaios de coimunoprecipitação. Cada marcação representa um experimento independente. Imunodeteccção para a PSD95 utilizando sinaptosomas do córtex de ratos tratados com (VEIC) ou A $\beta$ Os<sub>42</sub> (300 nM), sinalizados com *camundongo* NU2 anti-A $\beta$ Os e subtraídos com *beads* magnéticos anti-*camundongo* IgG; Imunodeteccção para o TRPA1 utilizando sinaptosomas do córtex de ratos tratados com (VEIC) ou A $\beta$ Os<sub>42</sub> (300 nM) sinalizados com *camundongo* IgG e subtraídos com *beads* magnéticos anti-*camundongo* IgG; Imunodeteccção das membranas com anti-*camundongo*. NL= fração eluída do material não- ligado; L= fração eluída do material ligado. VEIC= veículo; PSD95= domínio pós-sináptico 95.

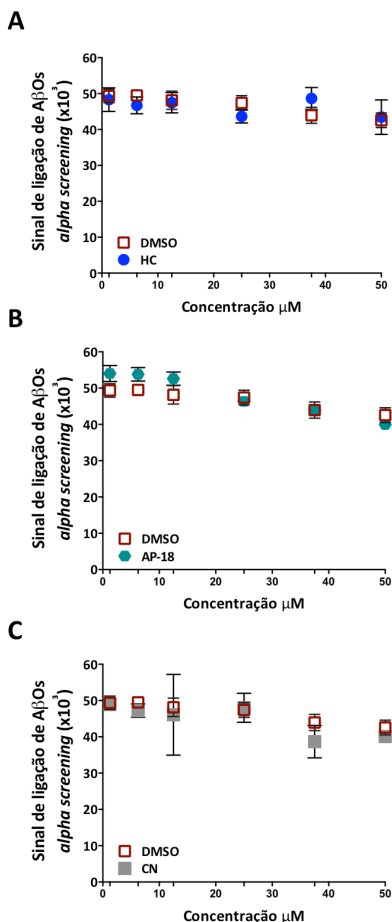
O próximo experimento consistiu na realização de um ensaio de ligação por *alpha screening*. Os sinaptossomas do córtex de ratos foram empregados com o objetivo de obter uma biblioteca de receptores, para serem incluídos em nanodiscos. Este ensaio pode ser efetuado para alcançar dois objetivos: verificar receptores responsáveis pela ligação de A $\beta$ Os às sinapses, bem como, prováveis compostos (tratamentos) que possam interferir nesta interação. Na Figura 18 podemos observar os resultados obtidos por *alpha screening* para a ligação de A $\beta$ Os<sub>42</sub> aos nanodiscos. É notável o sinal positivo da interação de A $\beta$ Os com os receptores presentes nos nanodiscos SMPL (biblioteca de proteínas de membrana solubilizadas; do inglês, *Solubilized Membrane Protein Library*), ao passo que, os nanodiscos POPC (palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina; do inglês, *Palmitoyl-Oleoyl-PhosphatidylCholine*) ou nanodiscos controles, que não apresentam a biblioteca de proteínas da membrana inserida, não apresentam ligação. Uma observação interessante feita neste ensaio foi o bloqueio de aproximadamente 60 % da ligação dos A $\beta$ Os aos nanodiscos, quando estes foram expostos ao HC030031 (Fig. 18). Uma vez que, a cada ensaio eram utilizados aproximadamente 300 compostos diferentes, foi utilizado neste ensaio o HC030031 na concentração de 10  $\mu$ M, a mesma concentração de todos os outros compostos do ensaio.





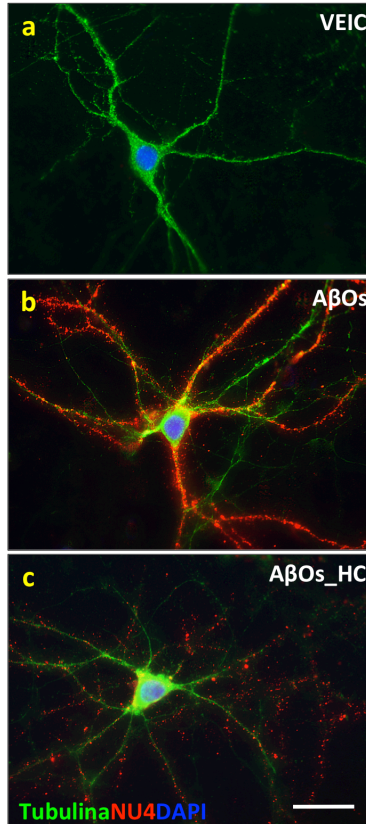
**Figura 18. Efeito do HC030031 sobre a ligação de AβOs aos nanodiscos no ensaio de alpha screening.** Nanodiscos teste (SMPL) foram preparados com biblioteca de receptores sinápticos obtidos de sinaptossomas e expostos ao antagonista do receptor TRPA1, HC03003 (10 μM). Representação gráfica dos dados da intensidade de luminescência emitida por nanodiscos ligados aos AβOs, expressos como porcentagem do grupo controle (SMPL). SMPL= biblioteca de proteínas de membrana solubilizadas, nanodiscos teste; POPC= palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina, nanodiscos controle. Os dados representam 3 experimentos independentes; n= 3, em duplicata. Os dados estão expressos como a média + E.P.M da intensidade de luminescência, expressos como porcentagem do grupo controle (SMPL). \* $p \leq 0,05$  comparado ao grupo POPC; # $p \leq 0,05$  comparado ao grupo SMPL. U.A.= unidades arbitrárias. ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* Newman-Keuls.

Objetivamos então realizar um ensaio mais objetivo, dado o efeito significativo do HC030031 no *screening*. Desta forma, realizamos uma curva dose-deslocamento empregando o HC030031, o AP-18 (outro antagonista TRPA1) e o CNH, um agonista TRPA1. Nesta etapa os dois antagonistas e o agonista do TRPA1 foram incubados com os nanodiscos em 6 diferentes concentrações 1,25; 6,25; 12,5; 25; 37,5 e 50  $\mu$ M. Este ensaio concentração-resposta foi realizado duas vezes de maneira independente, resultando em gráficos muito similares. Observa-se nos gráficos da Figura 19 que nenhum dos compostos – HC030031 (Fig. 19A), AP-18 (Fig. 19B) e CNH (Fig. 19C) – em quaisquer concentrações testadas, promoveram a alteração da ligação de A $\beta$ Os<sub>42</sub>. Além destes, controles positivos foram utilizados em todos os testes (dados não mostrados). Estes resultados destacam a importância da realização de testes independentes, que podem evitar a fabricação de resultados a partir de artefatos ou falso-positivos.

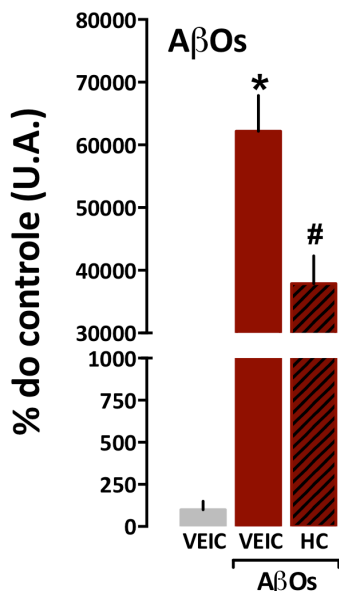


**Figura 19. Curva concentração-resposta dos antagonistas e agonista do receptor TRPA1 no ensaio de ligação.** Nanodiscos teste (SMPL) foram preparados com biblioteca de receptores sinápticos obtidos de sinaptossomas e expostos aos antagonistas do TRPA1 HC03003 (HC) e AP-18, ou ao agonista do TRPA1 CNH, nas concentrações de 1,25; 6,25; 12,5; 25; 37,5 e 50  $\mu\text{M}$ . Representação gráfica dos dados da intensidade de luminescência emitida por nanodiscos ligados aos A $\beta$ Os. SMPL= biblioteca de proteínas de membrana solubilizadas, nanodiscos teste; POPC= palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina, nanodiscos controle. Os dados representam 2 experimentos independentes; n= 3, em duplicata. Os dados estão expressos como a média  $\pm$  E.P.M da intensidade de luminescência.

O último ensaio executado para investigar a veracidade da hipótese inicial foi realizado em cultura de células. Neurônios receberam tratamento prévio com VEIC ou com HC030031 e foram expostos aos A $\beta$ Os<sub>42</sub>, e a ligação foi avaliada por intensidade de fluorescência. A Figura 20 apresenta fotos representativas dos neurônios que foram marcados com  $\beta$ III-tubulina em fluorescência verde. Os A $\beta$ Os foram marcados com NU4 anti-A $\beta$ Os (fluorescência vermelha). O marcador nuclear DAPI é visualizado em azul. Após 1 h de incubação, os A $\beta$ Os ligam-se aos dendritos neuronais massivamente (Fig. 20b), o que não ocorre nos neurônios tratados com VEIC (Fig. 20a). Quando os neurônios foram pré-tratados com o antagonista TRPA1, HC030031, ocorreu redução acentuada da ligação de A $\beta$ Os aos dendritos, como pode ser observado na Figura 20c. A quantificação das imagens foi realizada com auxílio do programa Metamorph®, utilizando como base os dendritos neuronais marcados para  $\beta$ III-tubulina e um limiar de marcação positiva, oriundo da marcação vermelho fluorescente. Como é retratado no gráfico da Figura 21, o tratamento prévio das células neuronais com HC030031 resultou na inibição de aproximadamente 40 % da ligação dos A $\beta$ Os aos dendritos.



**Figura 20. Efeito do antagonista do receptor *TRPA1* na ligação de AβOs aos dendritos neuronais.** O ensaio de imunocitoquímica foi realizado em cultura primária de neurônios hipocampais (21 DIV), que foram tratados com VEIC ou HC030031 (HC; 0,03  $\mu$ M) por 30 min e em seguida expostas ao VEIC ou aos AβOs<sub>42</sub> (500 nM) por um período de 1 h. As imagens são representativas da imunomarcagem para tubulina (verde), anticorpo NU4 anti-AβOs (vermelho) e DAPI, marcador nuclear (azul) em neurônios pré-tratados com VEIC e em seguida exposto ao (a) veículo ou aos (b) AβOs; ou neurônios (c) pré-tratados com HC030031 e expostos aos AβOs. VEIC= veículo; HC= HC030031, antagonista *TRPA1*. Foram realizados 3 ensaios independentes em triplicata. As imagens para análise foram capturadas de 5 diferentes campos para cada repetição utilizando microscópio invertido epifluorescente, em um aumento de 600x. Escala= 25  $\mu$ m.



**Figura 21. Efeito do HC030031 na ligação dos AβOs aos dendritos neuronais** O ensaio de imunocitoquímica foi realizado em cultura primária de neurônios hipocampais (21 DIV), que foram tratados com VEIC ou HC030031 (HC; 0,03  $\mu$ M) por 30 min e em seguida expostas ao VEIC ou aos AβOs<sub>42</sub> (500 nM) por um período de 1 h. Representação gráfica dos dados de intensidade de fluorescência. Os dados são apresentados como média + E.P.M da intensidade de fluorescência, expressos como porcentagem do grupo controle (VEIC). VEIC= veículo; HC= HC030031, antagonista TRPA1. \* $p \leq 0,05$  comparado ao grupo VEIC; # $p \leq 0,05$  comparado ao grupo AβOs. U.A.= unidades arbitrárias. ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc Newman-Keuls*. Foram realizados 3 ensaios independentes em triplicata. As imagens para análise foram capturadas de 5 diferentes campos para cada repetição.

O sumário dos resultados apresentados neste bloco é apresentado na Tabela 3. Os resultados, em conjunto, sugerem que o TRPA1 participa da ligação dos AβOs aos neurônios, e que, esta ligação é preferencialmente extra-sináptica.

Tabela 3. Sumário dos resultados relacionados à ligação dos AβOs ao receptor TRPA1

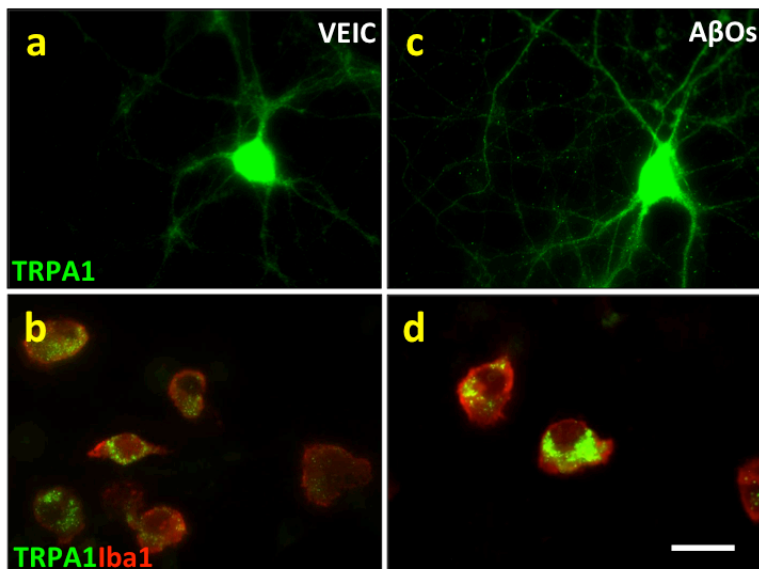
Sumário de resultados - 3	
Descrição	Resultado
Os AβOs <sub>42</sub> ligam-se ao TRPA1 nos dendritos de células neuronais	✓
Os AβOs <sub>42</sub> e o TRPA1 coimunoprecipitam em amostras de sinaptossoma	✓
Efeito do HC sobre a ligação de AβOs <sub>42</sub> às sinapses por <i>alpha screening</i> .	✗
Efeito do HC sobre a ligação de AβOs <sub>42</sub> aos dendritos neuronais	➡

➡ = DIMINUI    ✓ = SIM    ✗ = NÃO

#### 4.4 O impacto do acúmulo de AβOs sobre a expressão do receptor TRPA1

A próxima pergunta de interesse abordou a relação que poderia ocorrer entre o TRPA1 e os AβOs. Nossa hipótese era de que ocorreria super-ativação ou -expressão deste receptor ao passo que os AβOs iriam se distribuindo e acumulando-se no encéfalo. Inicialmente testamos esta teoria – utilizando duas diferentes técnicas, a técnica de imunocitoquímica e *western blotting* – em células de cultura primária de neurônios, microglias e astrócitos. A Figura 22 ilustra a expressão de TRPA1, através de imunocitoquímica, em neurônios e microglias após o desafio com os AβOs<sub>42</sub> por 15 h. A distribuição de TRPA1 (fluorescência verde) parece mais acentuada nos neurônios tratados com AβOs (Fig. 22c) do que naqueles tratados com VEIC (Fig. 22a). Já nas células microgliais é visível o aumento da expressão de TRPA1 quando ocorreu o tratamento com AβOs (Fig. 22d), comparadas as células tratadas com VEIC (Fig. 22b). O marcador microglial Iba-1 aparece nas imagens em fluorescência vermelha.

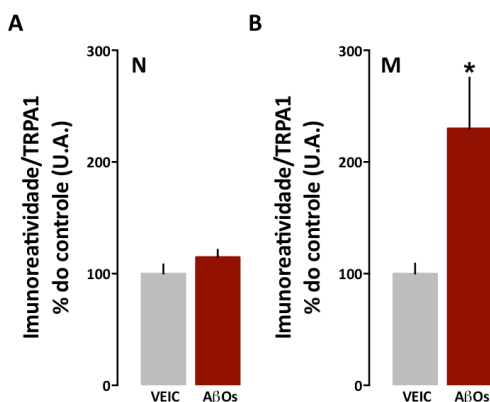




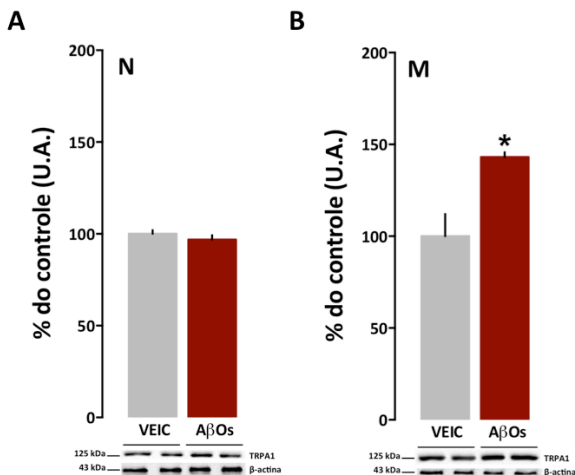
**Figura 22. Expressão do receptor TRPA1 em células neuronais e microgliais após a exposição aos AβOs.** A cultura primária de células foi realizada a partir do hipocampo e do cortex de embriões de ratos (E18) e os ensaios de imunocitoquímica foram realizados após 17 DIV. Imagens representativas da imunomarcagem para TRPA1 (verde) em células neuronais (painel superior) e microgliais (painel inferior) que foram tratadas com (a,b) VEIC ou com (c,d) AβOs<sub>42</sub> (500 nM) por 15 h. Iba-1, marcador para microglias; Foram realizados 5 ensaios independentes em quintuplicata para cada condição. As imagens para análise foram capturadas de 5 diferentes campos para cada repetição utilizando microscópio invertido epifluorescente, em um aumento de 600x. Escala= 25 μm.

A quantificação das imagens obtidas nos ensaios de imunocitoquímica foi feita através do programa Metamorph® e os gráficos são mostrados na Figura 23. O aumento da expressão de TRPA1 foi significativo nas células microgliais (Fig. 23B). Surpreendentemente, nenhuma diferença significativa foi encontrada nas células neuronais (Fig. 23A). A seguir, análises semi-

quantitativas foram realizadas por *Western blotting* a fim de corroborar estes resultados. Os dados são apresentados nos gráficos da Figura 24, juntamente com as bandas representativas. Não houve diferença significativa na expressão de TRPA1 nos neurônios (Fig. 24A), entretanto, nas microglias (Fig. 24B), mais uma vez este aumento foi evidente.



**Figura 23. Análise da imunoreatividade para o receptor TRPA1 em cultura de células neuronais e microgliais após a exposição aos AβOs.** O ensaio de imunocitoquímica foi realizado em cultura primária de neurônios hipocampais e de microglias corticais (17 DIV), que foram expostas ao VEIC ou aos AβOs<sub>42</sub> (500 nM) por um período de 15 h. Representação gráfica da quantificação da imunoreatividade para o TRPA1 em células (A) neuronais, N; e (B) microgliais, M; de cultura primária. Os dados são apresentados como média + E.P.M da intensidade de fluorescência das imagens e expressos como porcentagem do grupo de controle (VEIC). \* $p \leq 0,05$  comparado ao grupo VEIC; teste *t* Student; U.A.= unidades arbitrárias. Foram realizados 5 ensaios independentes em quintuplicata para cada condição. As imagens para análise foram capturadas de 5 diferentes campos para cada repetição.

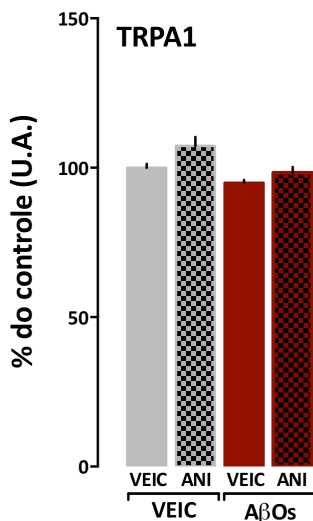


**Figura 24. Efeito da exposição aos AβOs sobre a expressão do receptor TRPA1 em cultura de células neuronais e microgliais.**

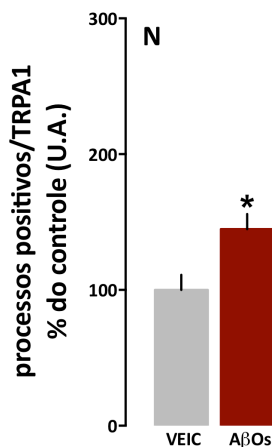
As células de cultura primária de neurônios hipocâmpais e de microglias corticais (17 DIV) foram expostas ao VEIC ou aos AβOs<sub>42</sub> (500 nM) por um período de 15 h. Representação gráfica da expressão de TRPA1 e imagem das bandas representativas, pela técnica de *western blotting*. O TRPA1 (125 kDa) e a β-actina (43 kDa) foram avaliados nas células (A) neuronais, N; e na células (B) microgliais, M; de cultura primária. Os dados são apresentados como média + E.P.M da razão de TRPA1/β-actina, e expressos como porcentagem do grupo controle (VEIC). \* $p \leq 0,05$  comparado ao grupo VEIC; teste *t* Student; U.A.= unidades arbitrárias. Foram realizados 2 experimentos independentes,  $n=3$  em duplicata.

Decidimos então avaliar mais detalhadamente a expressão do receptor TRPA1 nas células neuronais, visto que, os resultados iniciais obtidos por imunocitoquímica, sugeriram que havia maior quantidade de TRPA1 nos dendritos dos neurônios tratados com AβOs, em comparação aos tratados com VEIC. Embora nas análises posteriores não foram observadas alterações quantitativas, mediante estes resultados, nós hipotetizamos que ocorreria uma redistribuição dos

receptores TRPA1 nos neurônios em momentos iniciais da exposição aos A $\beta$ Os. Desta forma, o próximo experimento foi desenhado para testar esta hipótese e para isso utilizamos a anisomicina (ANI), um fármaco antibiótico, inibidor da síntese proteica. As culturas neuronais foram pré-tratadas com ANI ou VEIC e em seguida tratadas com A $\beta$ Os<sub>42</sub> ou VEIC. Na Figura 25 é possível observar que o tratamento com a ANI nas células não promoveu nenhuma alteração significativa na expressão de TRPA1, tanto nas células tratadas com VEIC, quanto nas células tratadas com A $\beta$ Os. Este foi um indicativo de que possivelmente ocorreria a redistribuição de TRPA1 nos dendritos. Na tentativa de confirmar estes dados, uma análise mais detalhada para os dados obtidos nos ensaios anteriores e para um novo ensaio de imunocitoquímica foi planejado. Desta vez, utilizando o programa Metamorph® os processos neuronais foram desenhados manualmente, um a um, para a obtenção de um limiar de marcação positiva para fluorescência verde (marcação para o TRPA1). Os valores de fluorescência de cada imagem foram então calculados com base neste limiar. Porém, um ponto importante foi considerado na análise: o valor obtido para cada corpo neuronal foi descontado do valor total das imagens, o que resultou em uma quantificação de processos positivos para o TRPA1 por imagem. Esta análise nos proporcionou observar diferença significativa na expressão de TRPA1 nos processos neuronais dos neurônios tratados com A $\beta$ Os, quando comparados ao VEIC (Fig. 26).



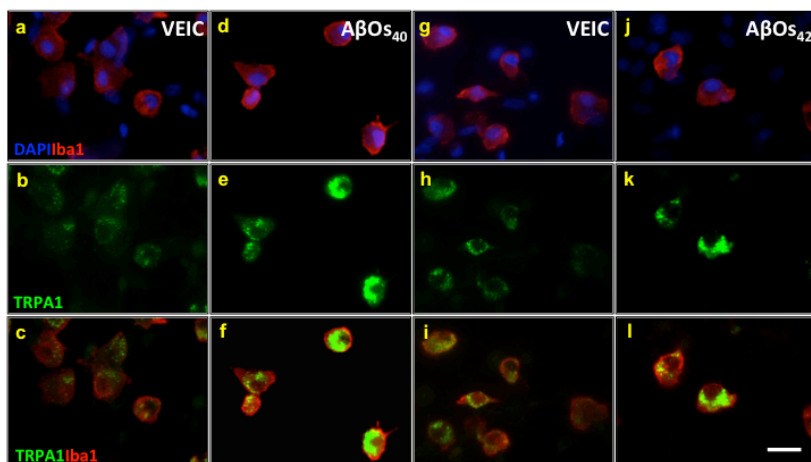
**Figura 25. Influência de um inibidor de síntese proteica sobre a expressão do receptor TRPA1.** O ensaio de imunocitoquímica foi realizado em cultura primária de neurônios hipocampais (17 DIV) que foram pré-tratados com veículo (VEIC) ou anisomicina (ANI; 1  $\mu$ M) 1h antes da exposição ao VEIC ou aos A $\beta$ Os<sub>42</sub> (500 nM) por um período de 24 h. Representação gráfica da quantificação da imureatividade para o TRPA1 em células neuronais. Os dados são apresentados como media + E.P.M da intensidade de fluorescência das imagens, expressos como porcentagem do grupo de controle (VEIC/VEIC). U.A.= unidades arbitrárias. Foram realizados 2 experimentos independente em quintuplicata.



**Figura 26. Quantificação dos processos neuronais imunorreativos para o receptor TRPA1.** O ensaio de imunocitoquímica foi realizado em cultura primária de neurônios hipocampais (17 DIV), que foram expostas ao VEIC ou aos AβOs<sub>42</sub> (500 nM) por um período de 15 h. Representação gráfica da quantificação da imureatividade para o TRPA1 em processos neuronais. Os dados são apresentados como media + E.P.M da intensidade de fluorescência das imagens, excluindo os corpos neuronais, e são expressos como porcentagem do grupo de controle (VEIC). \* $p \leq 0,05$  comparado ao grupo VEIC; teste *t* Student; U.A.= unidades arbitrárias. Foram realizados 2 experimentos independentes em quintuplicata para cada condição. As imagens para análise foram capturadas de 5 diferentes campos para cada repetição.

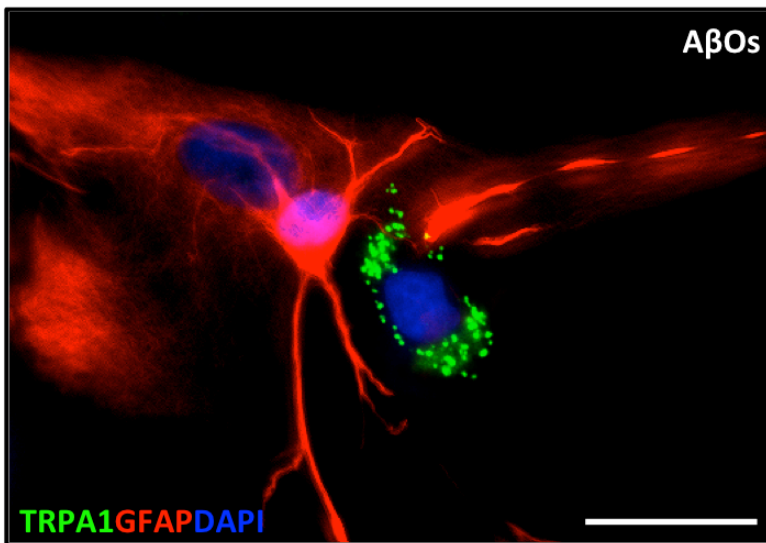
Ainda em relação às células microgliais, é importante destacar que o aumento da expressão de TRPA1 observado é independente da natureza sequencial do peptídeo utilizado. Esta afirmação é feita com base nos resultados elucidados na Figura 27. Observa-se o aumento da expressão de TRPA1 (fluorescência verde) nas células microgliais tratadas com ambos AβOs<sub>40</sub> (Fig. 27d-f) e AβOs<sub>42</sub> (Fig. 20j-l), em relação aos seus respectivos veículos (Fig. 27a-c; g-i). O

marcador Iba-1 (fluorescência vermelha) foi utilizado para diferenciar as células microgliais, visto que, este experimento foi realizado em cultura de células astrogliais (astrócitos e microglias). Outro aspecto importante a ser considerado é a ausência de efeito dos A $\beta$ Os (ambas as sequências), sobre a expressão de TRPA1 nos astrócitos. A Figura 28 projeta uma célula microglial e duas células astrocitárias, justapostas, sendo que, esta foto foi capturada de um poço tratado com A $\beta$ Os<sub>42</sub>. Ao passo que a microglia apresenta uma marcação expressiva para o TRPA1 (fluorescência verde), o astrócito em fluorescência vermelha – diferenciado pelo marcador GFAP – não apresenta nenhuma marcação para este receptor. O marcador DAPI em azul diferencia os núcleos celulares.



**Figura 27. A expressão do receptor *TRPA1* em células microgliais microgliais expostas aos  $A\beta Os_{40}$  ou  $A\beta Os_{42}$ .** Imagens representativas da imunomarcção para o *TRPA1* (verde) e *Iba-1* (vermelho) em cultura de células astrogliais. DAPI (azul), marcador nuclear. Um grupo de células foi tratado com **a-c** veículo (VEIC) ou **d-f**  $A\beta Os_{40}$  (1  $\mu M$ ), enquanto outro grupo de células foi tratado com **g-i** veículo (VEIC) ou **j-l**  $A\beta Os_{42}$  (500 nM) durante 24 h. Foram realizados 2 experimentos independentes em triplicata para cada condição. As imagens para análise foram capturadas de 5 diferentes campos para cada repetição utilizando microscópio invertido epifluorescente, em um aumento de 600x. Escala= 25  $\mu m$ .

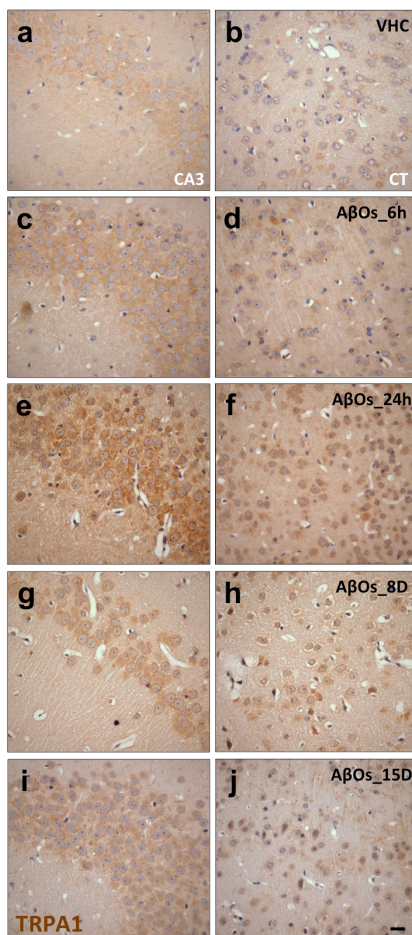




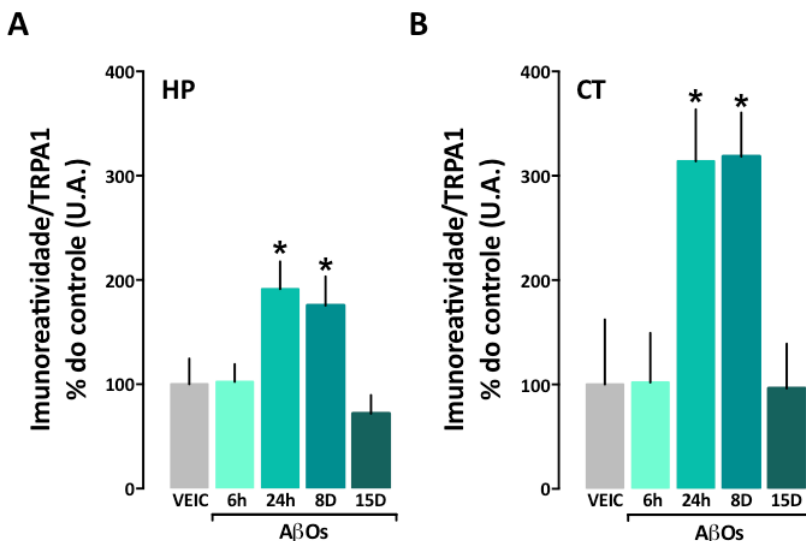
**Figura 28. A expressão do receptor TRPA1 em células microgliais e astrocitárias expostas AβOs.** Imagem representativa evidenciando a presença de dois astrócitos e uma microglia lado a lado. Os astrócitos foram imunomarcados para GFAP (vermelho), um marcador astrogliar, e não expressam TRPA1 (verde). A microglia expressa TRPA1 após 24 h de exposição com AβOs<sub>42</sub> (500 nM). Escala= 25 μm.

Após observar estes distintos fenômenos *in vitro*, objetivamos examinar mais detalhadamente a expressão de TRPA1 frente aos AβOs. Para tanto, utilizamos encéfalos de animais Swiss que foram injetados com VEIC ou com AβOs, para realizar técnicas de imunoistoquímica e *Western blotting*. Na Figura 29 estão demonstradas imagens representativas do hipocampo e córtex de camundongos, tratados por via i.c.v. com VEIC (a,b) e AβOs<sub>40</sub>, após diferentes intervalos de tempo: 6 h (c,d), 24 h (e-f), 8 D (g-h) e 16 D (i-j). A coloração castanha é indicativa de reação positiva para o TRPA1 (Fig. 29). Nota-se a expressão basal de TRPA1 no hipocampo (CA3) e no córtex (CT) dos animais tratados

com VEIC (Fig. 29a,b). É relevante mencionar que os dados do grupo controle foram analisados com amostras de animais tratados com VEIC, e os encéfalos foram coletados nos quatro diferentes tempos. As imagens exibem um aumento de TRPA1 decorrente do tratamento com os A $\beta$ Os (Fig. 29c-j). O gráfico com a quantificação das imagens é apresentado na Figura 30. Desta perspectiva, é possível observar no hipocampo (HP) (Fig. 30A) e no córtex (CT) (Fig. 30B) dos animais, um aumento estatisticamente significativo nos períodos de 24 h e 8 dias após o tratamento com os A $\beta$ Os, em comparação ao grupo VEIC.

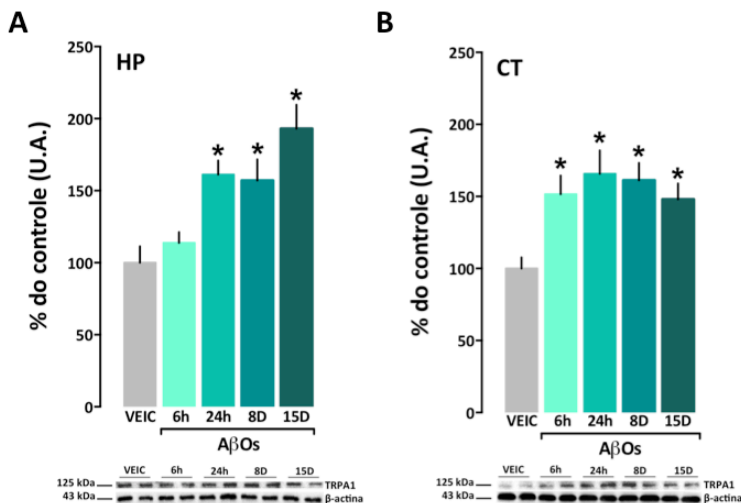


**Figura 29. Decurso temporal da expressão do receptor TRPA1 nos encéfalos de camundongos Swiss após a administração i.c.v. de AβOs.** Imagens representativas da imunomarcagem para o TRPA1 na sub-região CA3 do hipocampo (HP) e no córtex (CT) de camundongos Swiss tratados com VEIC ou AβOs<sub>40</sub> (400 pmol/sítio; i.c.v.). Os encéfalos foram coletados **c-d** 6 h, **e-f** 24 h, **g-h** 8 dias ou **i-j** 15 dias (D) após a injeção com AβOs ou com **a-b** VEIC. A coloração castanho-avermelhada indica reação positiva para TRPA1 contrastada com hematoxilina (azul). VEIC= veículo. Foram realizados 3 ensaios independentes; n= 4 animais por grupo. As imagens foram capturadas utilizando microscópio óptico, em um aumento de 400x. Escala= 25 µm



**Figura 30. Avaliação da expressão do receptor TRPA1 nos encéfalos de camundongos Swiss após a administração i.c.v. de AβOs.** Os encéfalos foram coletados 6 h, 24 h, 8 dias ou 15 dias (D) após a administração de veículo (VEIC) ou AβOs<sub>40</sub> (400 pmol/sítio; i.c.v.). Representação gráfica da expressão de TRPA1 no (A) hipocampo, HP; e no (B) córtex, CT; de camundongos Swiss tratados com VEIC ou AβOs. Os dados são apresentados como media + E.P.M da intensidade de pixels, expressos como porcentagem do grupo de controle (VEIC). O grupo veículo representa a média da análise de todos os pontos temporais. VEIC= veículo; Foram realizados 3 ensaios independentes; n= 4 animais por grupo. Foram analisadas as imagens capturadas das sub-regiões CA1, CA3 e giro denteado do hipocampo, e do córtex, utilizando microscópio óptico, em um aumento de 400x. \* $p \leq 0,05$  comparado ao grupo VEIC; U.A.= unidades arbitrárias. ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* Newman-Keuls.

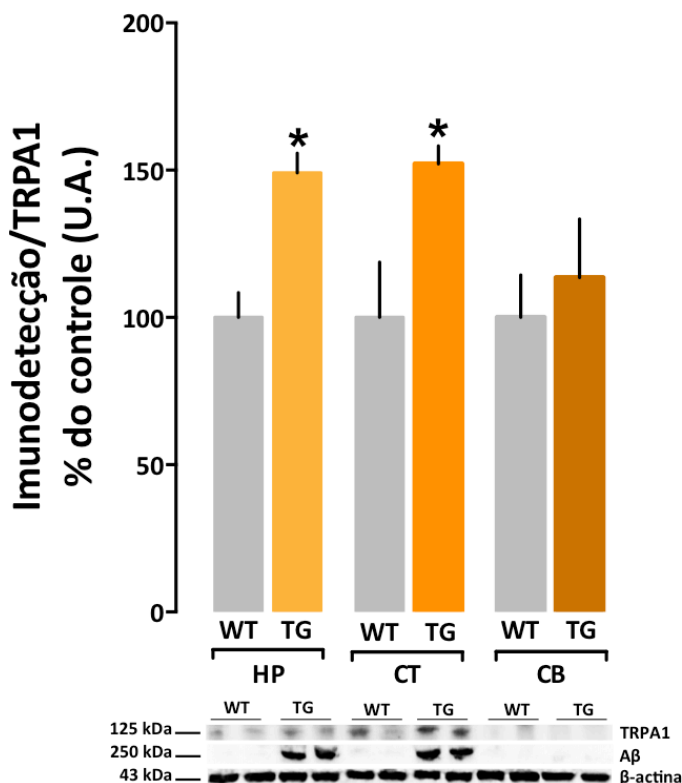
Com a finalidade de ratificar estes resultados, foi avaliada também a expressão de TRPA1, nos encéfalos de animais *Swiss* injetados por via i.c.v. com VEIC ou com A $\beta$ Os, através de *western blotting*. Conforme ilustrado na Figura 31, houve aumento dos níveis de expressão de TRPA1 no hipocampo a partir de 24 h após a injeção i.c.v. de A $\beta$ Os<sub>40</sub>, sendo que a maior expressão ocorreu após 15 dias (Fig. 31A). No córtex (Fig. 31B) a expressão de TRPA1 apresentou-se elevada 6 h após a administração de A $\beta$ Os<sub>40</sub>, permanecendo assim até o último período avaliado (15 D). Considera-se importante salientar que as diferenças encontradas nas duas diferentes análises podem ser atribuídas ao fato de que na técnica de *western blotting* é utilizada a totalidade do tecido a ser avaliado, enquanto que na técnica de imunoistoquímica são utilizadas fatias do tecido.



**Figura 31. Decurso temporal da imunodeteção para o receptor TRPA1 nos encéfalos de camundongos Swiss após a administração i.c.v. de AβOs.** Os encéfalos foram coletados 6 h, 24 h, 8 dias (D) após a administração de veículo (VEIC) ou AβOs<sub>40</sub> (400 pmol/sítio; i.c.v.). Representação gráfica da expressão de TRPA1 e imagens representativas das bandas obtidas por *western blotting* para o TRPA1 (125 kDa) e para a β-actina (43 kDa) no (A) hipocampo, HP; e no (B) córtex, CT; de camundongos Swiss tratados com VEIC ou com AβOs<sub>40</sub>. Os dados são apresentados como média + E.P.M da razão de TRPA1/β-actina, e expressos como porcentagem do grupo controle (VEIC). VEIC= veículo. \* $p \leq 0,05$  comparado ao grupo VEIC; U.A.= unidades arbitrárias. ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc Newman-Keuls*. Os gráficos representam a análise de 3 experimentos independentes; n= 4 animais por grupo.

Ainda, buscando confirmar os resultados obtidos em modelos agudos *in vitro* e *in vivo*, foi avaliada a expressão de TRPA1 em outro modelo animal relacionado a DA. Neste sentido, foi investigada a expressão deste receptor em animais transgênicos para a doença, um modelo crônico, com um perfil de

progressão que mais se assemelha ao que acontece durante a progressão da doença em humanos. A Figura 32 apresenta as análises quantitativas para as bandas obtidas por imunodeteção do TRPA1 em animais transgênicos (TG) 5xFAD e WT. As análises apontaram aumento significativo da expressão de TRPA1 no hipocampo (HP) e córtex (CT) dos animais TG em comparação aos animais WT, e também, em comparação ao cerebelo (CB) (Fig. 32). O cerebelo foi utilizado como um controle, por ser uma área não relacionada à memória e reconhecida por não ser afetada por acúmulo de A $\beta$ Os. Notavelmente, foi possível observar nas bandas representativas da imunodeteção para A $\beta$  que, tanto o HP quanto o CT dos animais TG apresentam acúmulo de A $\beta$ , potencialmente fibrilas, dado o elevado peso molecular (Fig. 32). Contudo, não houve detecção positiva para A $\beta$  no cerebelo de ambos os grupos WT e TG. Este resultado confirmou uma vez mais o aumento da expressão de TRPA1, em decorrência do acúmulo de A $\beta$ .

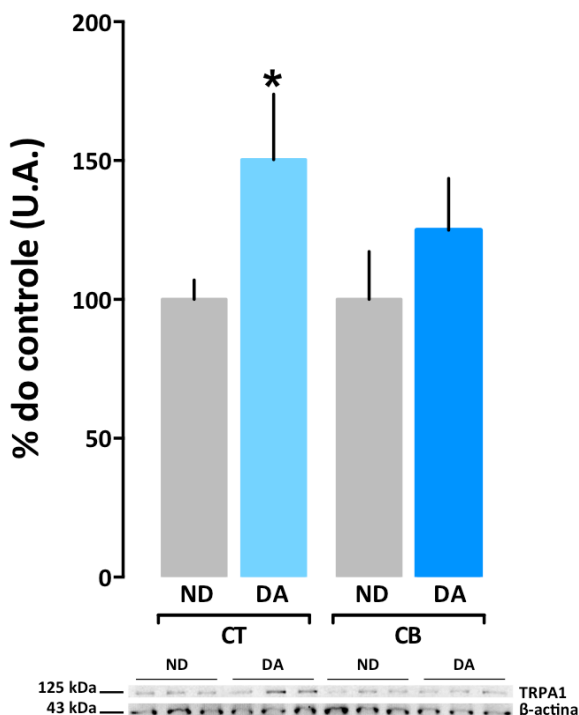


**Figura 32. Expressão do receptor TRPA1 em diferentes regiões encefálicas de camundongos transgênicos 5xFAD.**

Representação gráfica da expressão de TRPA1 e imagens representativas das bandas obtidas por *western blotting* para o TRPA1 (125 kDa), placas fibrilares de A $\beta$  (225 kDa) e  $\beta$ -actina (43 kDa) no hipocampo (HP), no córtex (CT) e no cerebelo (CB) de camundongos transgênicos (TG) 5xFAD (7 meses de idade) e camundongos *wild-type* (WT). Os dados são apresentados como média + E.P.M da razão de TRPA1/ $\beta$ -actina, e expressos como porcentagem do grupo controle (WT), correspondente para cada região. \* $p \leq 0,05$  comparado ao grupo WT; teste *t* Student; U.A.= unidades arbitrárias. Foram realizados 2 experimentos independentes;  $n = 4$  animais por grupo.



O próximo e último passo consistiu na utilização de amostras de encéfalo de humanos, portadores da DA – diagnosticados clinicamente em vida e confirmados por análises *post mortem* – e encéfalos de pacientes controles, que foram pareados por idade e sexo e que, não possuíam nenhum tipo de demência senil. Foram utilizadas amostras do córtex e do cerebelo destes pacientes para a realização da técnica de western *blotting*. Observa-se tanto nas bandas representativas quanto nos gráficos obtidos das análises das bandas, que há aumento significativo da expressão de TRPA1 no córtex (CT) dos pacientes portadores da doença de Alzheimer (Fig. 33 “DA”), quando comparados a mesma área dos pacientes sadios ou controles (Fig. 36 “ND”). Mais uma vez, a região cerebelar foi utilizada como controle. A Figura 33 mostra ainda, níveis constitutivos de TRPA1 no cerebelo (CB), comparáveis aos do CT. Contudo, não há aumento significativo do TRPA1 no CB dos pacientes portadores da DA.



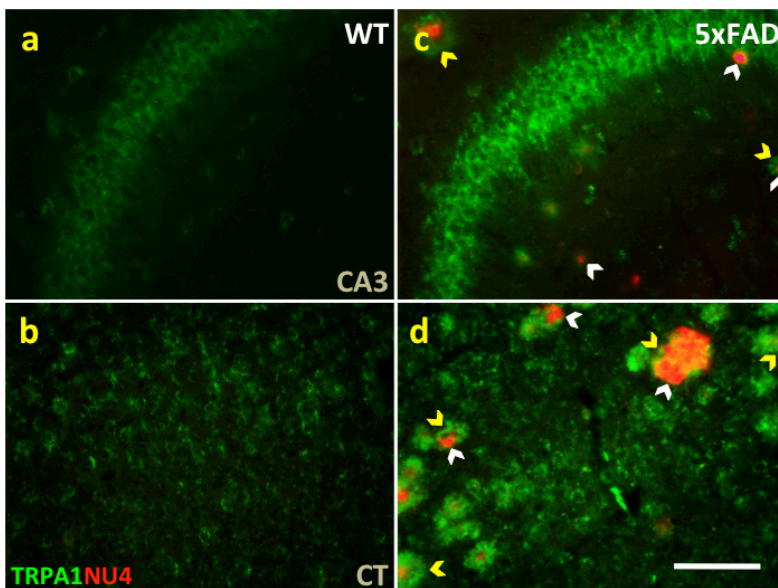
**Figura 33. Expressão do receptor TRPA1 no encéfalo de pacientes diagnosticados com a doença de Alzheimer.** Representação gráfica da expressão de TRPA1 e imagens representativas das bandas obtidas por *western blotting* para o TRPA1 (125 kDa) e para a  $\beta$ -actina (43 kDa), no córtex (CT) e no cerebelo (CB) de pacientes diagnosticados com doença de Alzheimer (DA) e pacientes não-dementes (ND). Os dados são apresentados como media + E.P.M da razão TRPA1/ $\beta$ -actina, e expressos como porcentagem do grupo controle (ND), correspondente para cada região. \* $p \leq 0,05$  comparado ao grupo ND; teste *t* Student; U.A.= unidades arbitrárias. Foram realizados 2 experimentos independentes;  $n = 3$  amostras por grupo.

Os dados aqui apresentados reúnem evidências obtidas em diferentes modelos: cultura de células primárias tratadas com A $\beta$ Os, animais *Swiss* injetados com A $\beta$ Os, animais transgênicos 5xFAD, e amostras de encéfalos de humanos portadores da DA, e os seus respectivos controles. Baseados nestas evidências pode-se inferir que, o acúmulo de A $\beta$ Os nos tecidos induz o aumento da expressão do receptor TRPA1.

#### *4.4.1 A relação entre a distribuição e o acúmulo de TRPA1 e dos A $\beta$ Os*

Objetivando pesquisar com mais detalhes a relação entre o acúmulo de A $\beta$ Os, e consequente expressão elevada de TRPA1, foram avaliados, por imunofluorescência, os encéfalos dos animais 5xFAD TG e WT, visto que, inicialmente, apenas análises semi-quantitativas foram realizadas. As análises foram realizadas apenas nas fatias dos encéfalos dos animais, devido a disponibilidade das amostras, em contraste com as amostras dos encéfalos humanos (dificuldade de coleta e acondicionamento). Nos resultados anteriormente demonstrados por *western blotting* foi verificada a expressão acentuada de TRPA1 e a presença de A $\beta$  no encéfalo dos animais TG em comparação aos animais WT. Desta forma, foi realizada uma dupla marcação por imunofluorescência para TRPA1 e A $\beta$ Os nas fatias de cada grupo. A imunodeteção positiva para o TRPA1 pode ser observada na Figura 34 através da fluorescência verde, enquanto que, para os A $\beta$ Os foi utilizado anticorpo primário fluorescente 568 NU4 anti-A $\beta$ Os, que é visualizado através da fluorescência vermelha. Características importantes e marcantes foram

observadas neste experimento. Primeiramente, a presença de TRPA1 constitutivo no hipocampo (CA3) e no córtex (CT) dos animais controles WT (Fig. 34a,b). Majoritariamente a marcação TRPA1 positiva estava presente contornando os corpos celulares neuronais tanto do CA3 quanto do CT, e em algumas projeções neuronais. Nenhum traço de marcação positiva para A $\beta$ Os foi encontrada no cérebro dos animais controles. Quando observados o CA3 e o CT dos animais TG foram evidenciadas alterações proeminentes: em primeira análise, aumento expressivo da imunomarcação para TRPA1, tanto no CA3 quanto no CT. Os achados mais surpreendentes, evidenciados com mais facilidade no CT, foram os grandes agregados de TRPA1 – como em círculos – em marcação distinta, em tamanho e em quantidade, daquela encontrada nos corpos celulares dos neurônios. Na sub-região CA3 do hipocampo estes mesmos grandes agregados de TRPA1 foram observados, especialmente na zona subsequente inferior à camada piramidal de corpos neuronais. Ao sobrepor as imagens da imunomarcação para TRPA1 e A $\beta$ Os pode-se observar que os grandes círculos de TRPA1 (setas amarelas) estavam, na verdade, circundando os grandes agregados de A $\beta$ Os tanto no CA3 quanto no CT (Fig. 34c,d). Esta última evidência, destacou-se de todos os resultados aqui encontrados. Era esperado encontrar A $\beta$ Os menores atacando os neurônios, como já anteriormente descrito, porém o achado marcante foi a disposição dos A $\beta$ Os em agregados maiores, de diferentes tamanhos (setas brancas), em ambas as regiões encefálicas analisadas.

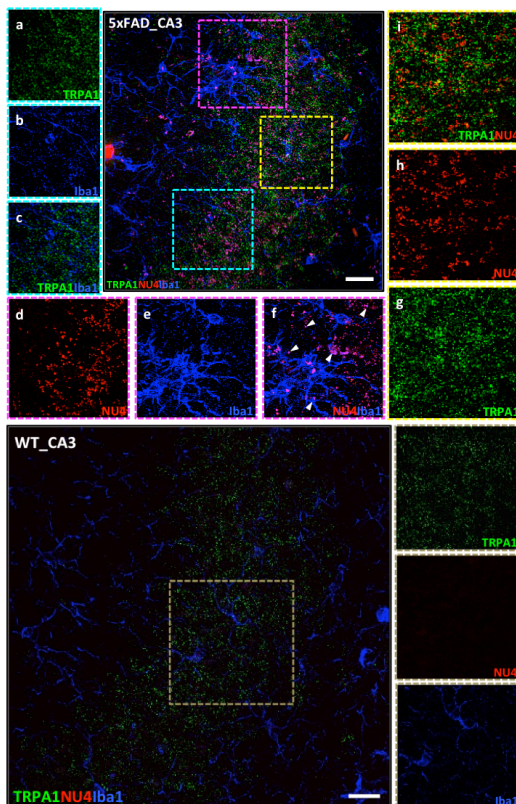


**Figura 34. Avaliação da distribuição do receptor TRPA1 e dos AβOs em encéfalos de camundongos transgênicos 5xFAD.** Imagens representativas da técnica de imunofluorescência para detecção de TRPA1 (verde) e AβOs<sub>42</sub>, utilizando anticorpo NU4 (vermelho) em camundongos (a,b) *wild-type*, WT; e camundongos (c,d) transgênicos 5xFAD de (7 meses de idade), mais especificamente no hipocampo (CA3) e córtex (CT). Setas amarelas exemplificam o agregados de TRPA1 circundando grandes agregados de AβOs, que por sua vez são exemplificados pelas setas brancas. Foram realizados 3 experimentos independentes; n= 4 animais por grupo. As imagens para análise foram capturadas utilizando microscópio invertido epifluorescente, em um aumento de 400x. Escala= 50 μm.

Este resultado conduziu-nos a realização de outros dois experimentos. As análises, em ambos os casos, necessitavam de maior precisão e, para isso, foi utilizada a microscopia confocal. No entanto, os dois experimentos eram de diferentes caracteres. O primeiro, de cunho exploratório, foi idealizado baseado na

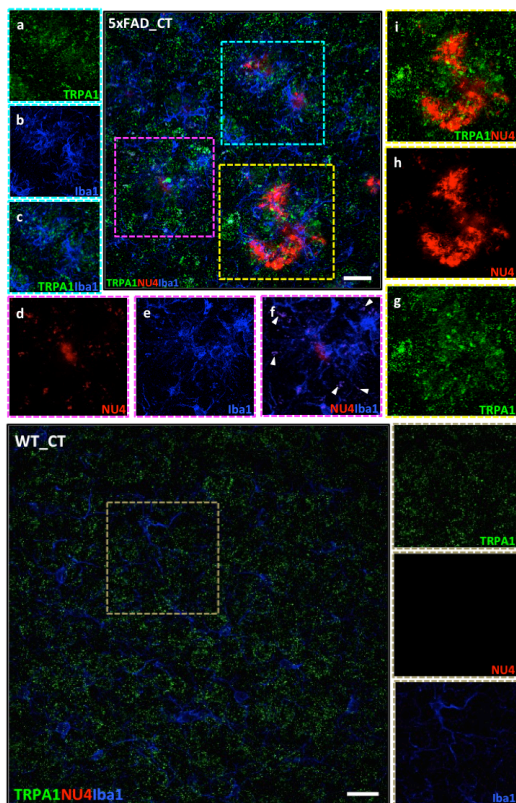
hipótese de que o TRPA1 estaria presente na microglia, que por sua vez, estaria circundando os grandes agregados de A $\beta$ Os. O segundo, de caráter discriminativo, foi realizado com a intenção de verificar a possível distinção entre placas fibrilares amilóides insolúveis e grandes agregados de A $\beta$ Os. Para isto, foi realizado um experimento de imunofluorescência de tripla marcação para TRPA1, A $\beta$ Os e microglia nas fatias dos animais 5xFAD TG e WT. As fotografias resultantes da projeção máxima do eixo “z” obtida por microscopia confocal, da sub-região CA3 dos animais TG (painel superior) e dos WT (painel inferior) são mostradas na Figura 35, bem como, para o CT são mostradas na Figura 36. Avaliando a Figura 35 e 36 (painéis superiores) da esquerda para direita, observa-se inicialmente a marcação para TRPA1 em verde (Fig. 35,36a) e para Iba-1 em azul (Fig. 35,36b). Há colocalização entre TRPA1 e Iba-1 (Fig. 35,36c), corroborando os achados *in vitro* sobre a existência do TRPA1 na microglia, representados pela cor ciano (azul claro). Além disso, na marcação para A $\beta$ Os em vermelho (Fig. 35,36d) e a marcação para Iba-1 (Fig. 35,36e), observa-se alguns fatos interessantes. Inicialmente, a detecção de oligômeros menores atacando os neurônios da camada piramidal (Fig. 35d), além dos grande agregados de A $\beta$ Os. A imagem resultante da colocalização entre os dois marcadores (magenta) é observada na Figura 35,36f. Nota-se que há um ataque microglial aos A $\beta$ Os menores em magenta, sinalizado pelas setas brancas. Outro aspecto importante a ser observado é a marcação para TRPA1 (Fig. 35g), que apresenta-se principalmente contornando os corpos celulares neuronais e dendritos. Maiores detalhes deste padrão de marcação neuronal são visualizados em fotografias de um plano único, também capturadas por

microscopia confocal, destacadas pelas setas amarelas (Fig. 37). Ainda, a marcação para os A $\beta$ Os (Fig. 35h), que em forma de oligômeros menores apareceram atacando diretamente os neurônios da camada piramidal, resultando em distinta colocalização entre ambos os marcadores, denotada pela cor amarela (Fig. 35i). Estes resultados confirmam os dados *in vitro*, mostrando a ligação de A $\beta$ Os ao TRPA1 nos neuritos. Por fim, no painel central está a fotomicrografia apresentando a colocalização dos três marcadores. Na Figura 35 representativa do CA3 a maior presença de A $\beta$ Os menores, enquanto que na Figura 36, representativa do córtex, nota-se a maior presença dos grandes agregados de A $\beta$ Os. Em ambos os casos, a microglia parece estar projetando-se contra os A $\beta$ Os, e o TRPA1 está expresso nas microglias. Quando estes achados no CA3 e CT dos animais 5xFAD TG (painéis superiores) – detalhadamente descritos acima – são comparados aos achados das mesmas regiões dos animais WT (painéis inferiores), torna-se evidente a diferença entre ambos. Nos encéfalos dos animais WT há uma menor migração/ativação microglial, menor expressão de TRPA1 e ausência completa de A $\beta$ Os. Os resultados obtidos nestes experimentos são de extrema importância, pelo fato de corroborarem os verificados anteriormente – *in vitro* e em modelo agudo relacionado à DA *in vivo* – e por ampliar nosso entendimento no que diz respeito a relação entre A $\beta$ Os e TRPA1.

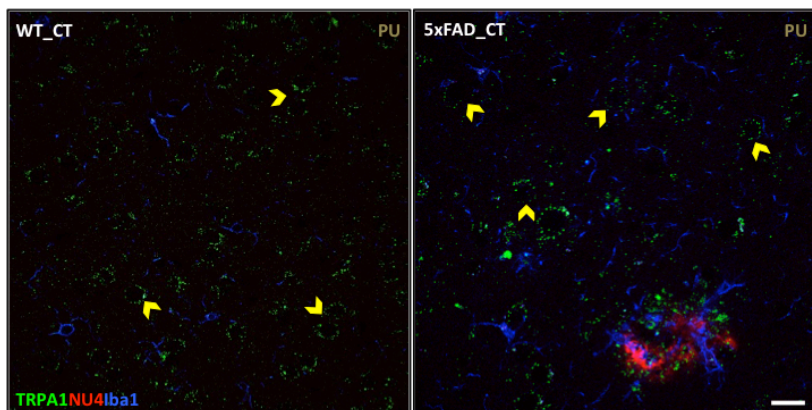


**Figura 35. Distribuição do receptor TRPA1 e dos AβOs e a expressão de células microgliais na sub-região CA3 do hipocampo de camundongos transgênicos 5xFAD.** Imagens representativas da tripla marcação por imunofluorescência para o TRPA1 (verde), AβOs<sub>42</sub> (NU4; vermelho) e microglia ativada (Iba-1; azul) na sub-região CA3 do hipocampo de camundongos transgênicos 5xFAD (7 meses de idade) (painel superior) e camundongos *wild-type* (WT) (painel inferior). Quadros ciano (a-c) representam a colocalização entre azul e verde; quadros magenta (d-f) representam a colocalização entre azul e vermelho (exemplificado pelas setas brancas); quadros amarelos (g-i) representam a colocalização entre verde e vermelho. Foram realizados 2 experimentos independentes; n= 3 animais por grupo. As figuras representam a projeção máxima de todas as imagens capturadas no eixo “z” utilizando microscópio confocal, em um aumento de 400x. Escala= 20 μm.





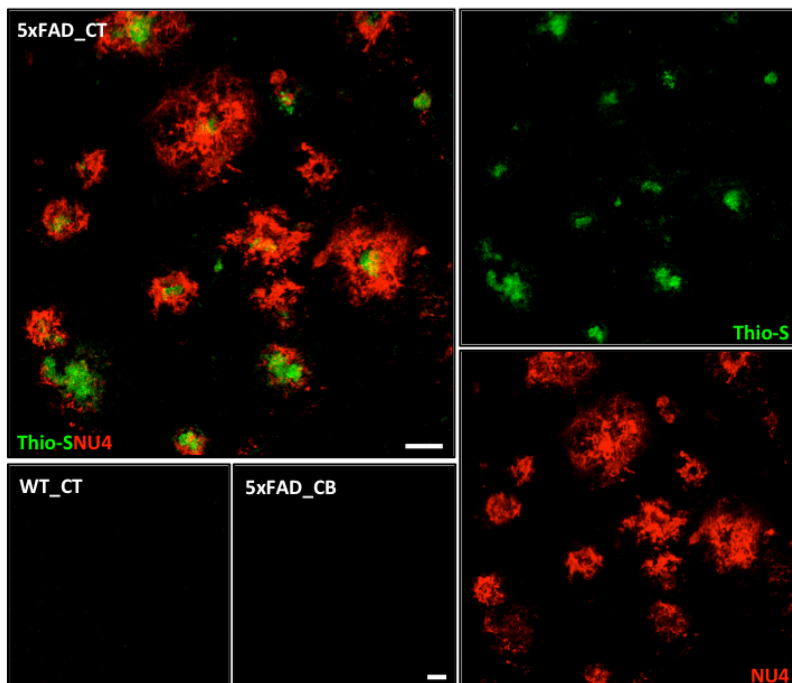
**Figura 36. Distribuição do receptor TRPA1 e dos AβOs e a expressão de células microgliais no córtex de camundongos transgênicos 5xFAD.** Imagens representativas da tripla marcação por imunofluorescência para o TRPA1 (verde), AβOs<sub>42</sub> (NU4; vermelho) e microglia ativada (Iba-1; azul) no córtex de camundongos transgênicos 5xFAD (7 meses de idade) (painel superior) e camundongos *wild-type* (WT) (painel inferior). Quadros ciano (a-c) representam a colocalização entre azul e verde; quadros magenta (d-f) representam a colocalização entre azul e vermelho (exemplificado pelas setas brancas); quadros amarelos (g-i) representam a colocalização entre verde e vermelho. Foram realizados 2 experimentos independentes; n= 3 animais por grupo. As figuras representam a projeção máxima de todas as imagens capturadas no eixo “z” utilizando microscópio confocal, em um aumento de 400x. Escala= 20 μm.



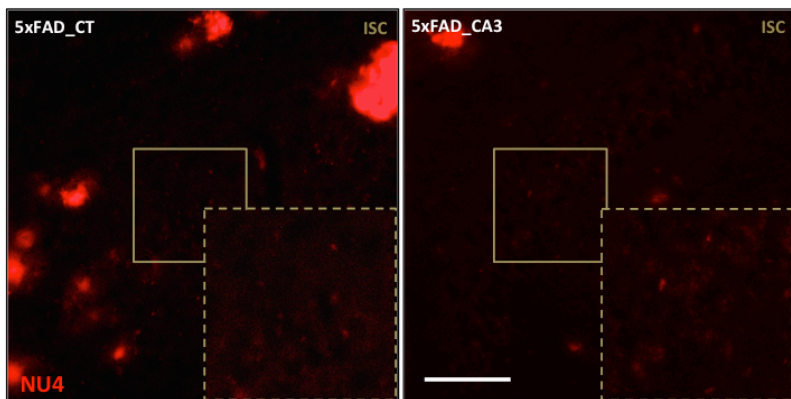
**Figura 37. Distribuição do receptor TRPA1 e dos AβOs e a expressão de células microgliais no córtex de camundongos transgênicos 5xFAD em plano único.** Imagens representativas da tripla marcação por imunofluorescência para o TRPA1 (verde), AβOs<sub>42</sub> (NU4; vermelho) e microglia ativada (Iba-1; azul) no córtex de camundongos *wild-type* (WT) e camundongos transgênicos 5xFAD (7 meses de idade). Setas amarelas= indicam o TRPA1 circundando os corpos neuronais. As figuras representam uma imagem capturada no eixo “z” (plano único; PU) através de microscopia confocal, em um aumento de 400x. Escala= 20 μm.

Para possibilitar a distinção dos oligômeros das placas fibrilares insolúveis de Aβ – utilizando as fatias dos encéfalos dos animais 5xFAD TG e WT foi utilizada a imunofluorescência para marcação de AβOs, seguida de contracoloração com Tioflavina-S (Thio-S). A imagem apresentada na Figura 38 nos permite visualizar no córtex (CT) dos animais 5xFAD TG as placas amilóides coradas com Thio-S (verde). Estas formam um centro denso, que é recoberto ou circundado por AβOs (vermelho). Os AβOs apresentam uma característica mais dispersa – em formato de nuvem ou halo – que na maioria das vezes, apresenta-se em torno das placas fibrilares insolúveis. Todavia, apenas alguns poucos exemplares de grandes agregados de AβOs, foram

encontrados nas análises, bem como placas fibrilares insolúveis que não estavam recobertas por A $\beta$ Os. Este achados foram vistos no CT (Fig. 38) e também no hipocampo (dados não mostrados) dos animais 5xFAD. Ainda, estas características patológicas não foram encontradas nem no cerebelo (CB) dos animais 5xFAD e nem nos encéfalos dos animais WT (Fig. 38). Através das imagens apresentadas na Figura 39 é possível interpretar, com mais clareza, a distribuição dos A $\beta$ Os. Tanto no CT quanto no CA3 ocorrem grandes agregados de A $\beta$ Os, porém, também são observados oligômeros menores – que parecem atacar diretamente os neurônios – como exemplificado na inserção (ISC; em bege) no centro da imagem (Fig. 39).



**Figura 38. Distinção entre os oligômeros e as placas de A $\beta$  em encéfalos de camundongos transgênicos 5xFAD.** Imagens representativas da dupla marcação para A $\beta$ Os<sub>42</sub> (NU4; vermelho) e placas fibrilares de A $\beta$  por Thioflavin-S (Thio-s; verde) no córtex (CT) e no cerebelo (CB) de camundongos *wild-type* (WT) e camundongos transgênicos 5xFAD (7 meses de idade). Foram realizados 3 experimentos independentes; n= 4 animais por grupo. As figuras representam a projeção máxima de todas as imagens capturadas no eixo “z” utilizando microscópio confocal, em um aumento de 400x. Escala= 20  $\mu$ m.



**Figura 39. Distribuição de AβOs no córtex e hipocampo de camundongos transgênicos 5xFAD.** Imagens representativas da técnica de imunofluorescência para detecção de AβOs<sub>42</sub> (NU4; vermelho) no tecido encefálico de camundongos transgênicos 5xFAD (7 meses de idade). Os quadros vazados, em bege, são uma inserção (ISC), que representam a ampliação da região demilitada ao centro. Evidencia-se pequenos AβOs solúveis, em nível neuronal. CT= córtex; CA3= sub-região CA3 do hipocampo. Foram realizados 3 experimentos independentes; n= 4 animais por grupo. As imagens foram capturadas utilizando microscópio invertido epifluorescente, em um aumento de 400x. Escala= 50 μm.

O resumo dos resultados apresentados neste bloco pode ser observado na Tabela 4. Coletivamente, estes dados sugerem uma estreita relação entre o acúmulo de AβOs e a expressão de TRPA1, tanto nas células neuronais, quanto nas células microgliais. Os quais podem também indicar um papel importante, e talvez divergente, deste receptor nos dois tipos celulares.

**Tabela 4. Sumário dos resultados relacionados ao acúmulo de A $\beta$ Os e a distribuição do receptor TRPA1**

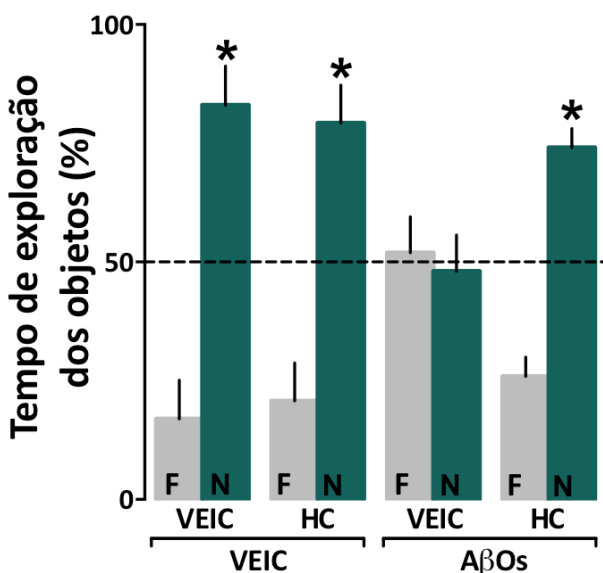
Sumário de resultados - 4	
Descrição	Resultado
Redistribuição do TRPA1 frente a exposição aos A $\beta$ Os <sub>42</sub> nas células neuronais	✓
Expressão do TRPA1 frente a exposição aos A $\beta$ Os nas células microgliais	➔
Expressão do TRPA1 frente a exposição ao A $\beta$ Os <sub>42</sub> nas células astrocitotárias	✗
Expressão do TRPA1 no hipocampo e córtex dos animais <i>Swiss</i> injetados i.c.v. com A $\beta$ Os <sub>40</sub> .	➔
Expressão do TRPA1 no hipocampo e córtex dos animais 5xFAD	➔
Expressão do TRPA1 no córtex dos pacientes portadores da DA	➔
O TRPA1 está expresso nas microgliais, que atacam os grandes agregados de A $\beta$ Os <sub>42</sub> no hipocampo e córtex dos animais 5xFAD	✓
Os grandes agregados de A $\beta$ Os <sub>42</sub> distinguem-se dos oligômeros menores e das placas fibrilares de A $\beta$	✓

➔ = AUMENTA    ✓ = SIM    ✗ = NÃO

#### **4.5 A importância do receptor TRPA1 para o déficit cognitivo induzido por A $\beta$ Os**

Sabendo da interação e da relação do TRPA1 com os A $\beta$ Os decidimos avaliar, em seguida, a possível participação do TRPA1 no déficit cognitivo reconhecidamente induzido pelos A $\beta$ Os. Consideramos esta etapa de extrema importância funcional, uma vez que o prejuízo cognitivo é o principal sintoma apresentado pelos portadores da DA. O teste do reconhecimento de objetos (RO) foi escolhido como teste padrão para este trabalho, pelo fato de requerer respostas comportamentais que são dependentes da ativação de áreas, principalmente o hipocampo, importantes para tarefas espaciais. Observa-se na Figura 40 o desempenho dos animais ao reconhecer os objetos como sendo familiares ou novos, durante a sessão de teste – que é interpretado com um índice de memória – e expressado como a porcentagem do tempo total de exploração. Os animais controles (VEIC/VEIC) exploram o objeto novo (N; barras verdes), no decorrer da sessão de teste, durante aproximadamente 80 % do tempo total de exploração. Por outro lado, o objeto familiar (F; barras cinzas) é explorado durante aproximadamente 20 % do tempo (Fig. 40). Os animais que foram injetados i.c.v. com A $\beta$ Os<sub>40</sub> (A $\beta$ Os/VEIC) não são capazes de diferenciar os objetos, visto que, gastaram aproximadamente 50 % do tempo de exploração em ambos os objetos. O pré-tratamento com o antagonista do receptor TRPA1, o HC030031 (HC) 3  $\mu$ M/sítio, não causou alteração na exploração dos objetos, quando comparados os resultados deste grupo (HC/VEIC) com os dos animais controles. Porém, foi observada uma alteração significativa para os animais que foram pré-tratados com HC e que receberam a injeção i.c.v. de

A $\beta$ Os<sub>40</sub> (HC/A $\beta$ Os). Estes apresentaram um desempenho similar ao dos animais controles, com um índice de discriminação de aproximadamente 75 % do objeto novo, em comparação ao objeto familiar. Este resultado sugere que os A $\beta$ Os requerem a ativação de TRPA1, ou seja, esta é necessária para a indução do déficit cognitivo.



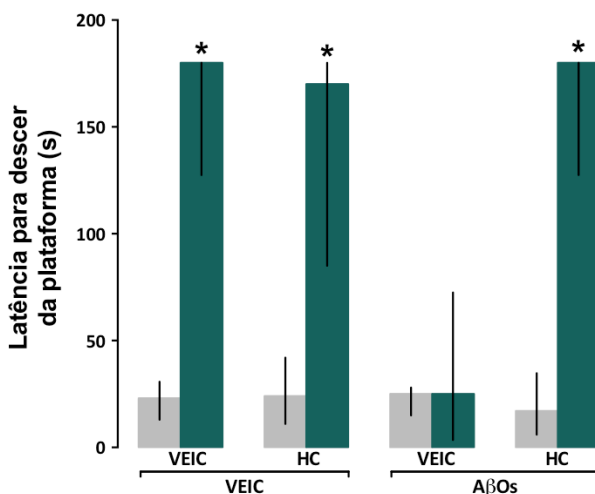
**Figura 40. O envolvimento do receptor TRPA1 no déficit cognitivo induzido por A $\beta$ Os<sub>40</sub> em camundongos Swiss.** O pré-tratamento com HC030031 (3  $\mu$ M/sítio) foi realizado 30 min antes da administração de veículo (VEIC) ou A $\beta$ Os<sub>40</sub> (400 pmol/sítio). O teste do reconhecimento de objetos (RO) foi realizado 14 dias após a injeção de VEIC ou A $\beta$ Os<sub>40</sub>. O gráfico representa a porcentagem do tempo de exploração do objeto familiar (F) e do objeto novo (N), em relação ao tempo total de exploração dos objetos. Os valores estão expressos como a média + E.P.M; \* $p \leq 0,05$  comparado ao objeto F do respectivo grupo; teste  $t$  Student; Foram realizados 2 experimentos independentes;  $n = 10$  animais por grupo.



Na tentativa de melhor compreender e confirmar estes dados experimentais foi planejado um segundo experimento. A mesma abordagem farmacológica foi utilizada, porém, avaliada em outro teste comportamental. O teste de esQUIVA passiva do tipo *step down* foi utilizado por promover respostas comportamentais que são principalmente dependentes do córtex e amígdala, regiões importantes para a formação da memória e emocionalidade. O gráfico apresentado na Figura 41 evidencia as respostas comportamentais de permanecer sobre a plataforma – expressada como a latência para descer da plataforma – 24 h após a sessão de treino (barras verdes). Semelhante ao que foi observado no experimento anterior, os animais controles (VEIC/VEIC) apresentaram bons índices de memória. A maioria dos animais permaneceu o tempo limite (180 s) sobre a plataforma. Já os animais que foram injetados por via i.c.v. com A $\beta$ Os<sub>40</sub> (A $\beta$ Os/VEIC) apresentaram prejuízo na sessão de teste, de forma que, permaneceram não mais que 50 s sobre a plataforma.

O pré-tratamento com o antagonista do receptor TRPA1, HC030031, parece não provocar alterações significativas na expressão deste comportamento, visto que, os animais deste grupo (HC/VEIC) apresentaram resultados comparáveis aos dos animais controles. Os animais que foram pré-tratados com HC e receberam A $\beta$ Os<sub>40</sub> (HC/A $\beta$ Os) apresentaram comportamento significativamente diferente dos animais A $\beta$ Os/VEIC. Isto foi evidenciado por permanência da plataforma, na sessão de teste, até o tempo limite (barras verdes), desempenho semelhante ao dos animais controles (Fig. 41). O teste do campo aberto foi realizado após este procedimento experimental com o objetivo de excluir a possibilidade de que déficits locomotores e exploratórios

tenham interferido no resultado. Deve-se ainda mencionar que, em ambos os testes comportamentais, RO e *step down*, o peptídeo inverso A $\beta$ Os<sub>40-1</sub>, também agregado, foi utilizado como controle (ambos os dados não mostrados). Este resultado obtido no teste de esquiva passiva *step down*, confirma a ideia do resultado anterior, obtido no RO. Em ambos os testes, o bloqueio prévio do receptor TRPA1 impediu os déficits de memória induzido por A $\beta$ Os; o que indica que o TRPA1 é ativado pelos A $\beta$ Os para ocorrer à indução da toxicidade.

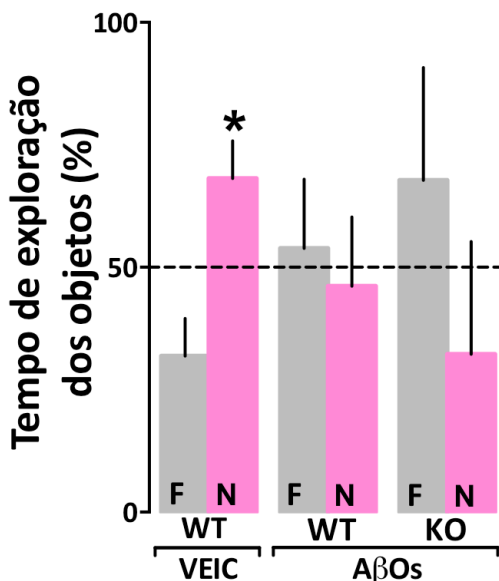


**Figura 41. A participação do receptor TRPA1 no déficit cognitivo induzido por A $\beta$ Os<sub>40</sub> em camundongos Swiss.** O pré-tratamento com HC030031 (3  $\mu$ M/sítio) foi realizado 30 min antes da administração de veículo (VEIC) ou A $\beta$ Os<sub>40</sub> (400 pmol/sítio). O teste de esquiva passiva do tipo *step down* foi realizado 14 dias após a injeção de VEIC ou A $\beta$ Os<sub>40</sub>. O gráfico representa a latência para descer da plataforma, o tempo limite de permanência foi de 180 s. As barras cinzas representam a sessão de treino e barras verdes a sessão de teste, 24 h após a sessão treino. Os dados estão expressos como mediana e intervalos interquartis (n = 8 animais por grupo). \* $p \leq 0,05$  em comparação com a sessão treino do respectivo grupo; teste não paramétrico pareado de *Wilcoxon*.

Partindo do pressuposto de que os A $\beta$ Os necessitam do receptor TRPA1 para induzir a toxicidade e o déficit cognitivo, foi empregada uma metodologia não farmacológica para confirmar esta hipótese. Para tanto, foram utilizados camundongos TRPA1 *knockouts* (KO), os quais foram administrados com A $\beta$ Os<sub>42</sub>. É possível observar no gráfico da Figura 42 o comportamento apresentado pelos animais do grupo controle (WT/VEIC) no RO, mostrando preferência pelo objeto novo (N; barras rosas; aprox. 70 %) em relação ao familiar (F; barras cinzas; aprox. 30 %). Como esperado, os animais WT que receberam injeção i.c.v de A $\beta$ Os<sub>42</sub> (WT/A $\beta$ Os) apresentaram déficit – quando comparados aos animais controles – evidenciado pelo tempo igual de exploração aos dois objetos (aprox. 50 %).

O resultado interessante foi encontrado nos animais KO que foram injetados com A $\beta$ Os<sub>42</sub> (KO/A $\beta$ Os). Ao contrário do esperado, os animais não apresentaram melhor performance no teste comportamental: os resultados foram similares aos encontrados para os animais WT/A $\beta$ Os (Fig. 42). Na verdade, apesar do erro, os animais gastaram mais tempo – aproximadamente 60 % – explorando o objeto familiar, em comparação aos aproximadamente 40 % explorando o objeto novo. Este resultado permitiu-nos levantar uma série de novas hipóteses, as quais versam sobre a importância da expressão basal do receptor TRPA1, bem como os possíveis mecanismos de compensação que podem afetar os animais que sofreram deleção gênica para esta proteína. Estas possíveis hipóteses serão discutidas em detalhes no próximo capítulo. Um dado extra, que auxilia a compreender este resultado, foi o dos níveis de A $\beta$ Os nos extratos de encéfalo destes animais, realizado através da técnica de detecção por *multiplex*. Este resultado indicou um acúmulo maior de A $\beta$ Os nos

animais KO do que nos animais WT que foram injetados com estes oligômeros (dados não mostrados). Neste experimento, extratos de encéfalos de animais 5xFAD TG foram utilizados como um controle positivo.



**Figura 42. Avaliação do déficit cognitivo induzido por AβOs<sub>42</sub> em camundongos com deleção gênica para o receptor TRPA1.**

O teste do reconhecimento de objetos (RO) foi realizado em camundongos *wild-type* (WT) e camundongos *knockouts* (KO) para o TRPA1 após a administração de veículo (VEIC) ou AβOs<sub>42</sub> (10 pmol/sítio). O gráfico representa a porcentagem do tempo de exploração do objeto familiar (F) e do objeto novo (N), em relação ao tempo total de exploração dos objetos. Os valores estão expressos como a média + E.P.M; \* $p \leq 0,05$  comparado ao objeto F do respectivo grupo; teste *t* Student; (WT/AβOs,  $n = 6$ ; WT/VEIC,  $n = 6$ ; KO/AβOs,  $n = 5$ ).

O sumário de resultados deste bloco de experimentos é mostrado na Tabela 5.

**Tabela 5. Sumário dos resultados da participação do receptor TRPA1 no déficit cognitivo induzido por AβOs**

Sumário de Resultados - 5	
Descrição	Resultado
Efeito do pré-tratamento com HC030031 sobre o déficit cognitivo induzido pelo AβOs <sub>40</sub>	→
Efeito da deleção gênica do TRPA1 sobre o déficit cognitivo induzido pelos AβOs <sub>42</sub>	↗

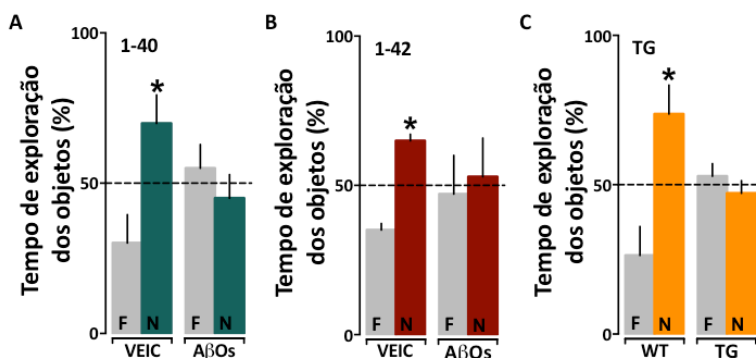
→ = DIMINUI   ↗ = AUMENTA

#### **4.6 Determinação do efeito benéfico do tratamento com HC030031, um antagonista TRPA1**

Até aqui, os resultados deste trabalho indicavam que o receptor TRPA1 desempenhava um papel crucial na indução da toxicidade e prejuízos comportamentais induzidos pelos A $\beta$ Os. Ainda, uma estreita relação entre ambos, sugerindo o receptor TRPA1 como um alvo atraente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a DA. Pretendendo demonstrar o possível papel benéfico do antagonismo do TRPA1, foram planejados experimentos comportamentais, baseados nos distintos modelos utilizados nesta tese, seguidos de análises de biologia molecular, para que pudessem suportar esta hipótese.

Inicialmente, são apresentados os dados comportamentais obtidos, empregando os diferentes modelos experimentais: animais *Swiss* injetados por via i.c.v. com A $\beta$ Os<sub>40</sub>, animais *Swiss* injetados por via i.c.v. com A $\beta$ Os<sub>42</sub> e animais 5xFAD TG, e os seus respectivos controles. Os animais que receberam injeção i.c.v foram avaliados no décimo quarto (14<sup>o</sup>) dia após a administração de uma das duas sequências de A $\beta$ Os. Os animais 5xFAD TG foram testados com 7 meses de idade, período no qual já apresentam intensa produção de A $\beta$ Os e formação de placas insolúveis fibrilares de A $\beta$ . A Figura 43 mostra, para fins de comparação, o tempo de exploração em porcentagem no RO para cada modelo animal utilizado. As barras N, representam o tempo de exploração do objeto novo, verdes para os animais injetados com os A $\beta$ Os<sub>40</sub>, vermelhas para os animais injetados com os A $\beta$ Os<sub>42</sub> e amarelas o comportamento para os animais TG. As barras F, representam o tempo de exploração do objeto familiar, em cinza para todos os modelos experimentais. Em

todos os casos, observa-se o mesmo padrão comportamental: os animais do grupo controle (VEIC ou WT) mostraram preferência pelo objeto novo em comparação ao familiar. Enquanto que, em todos os modelos experimentais relacionados à DA (A $\beta$ Os<sub>40</sub>, A $\beta$ Os<sub>42</sub> ou TG) não houve preferência por nenhum dos dois objetos, como acontece durante a sessão de treino, indicando clara evidência de déficit de memória (Fig. 43).

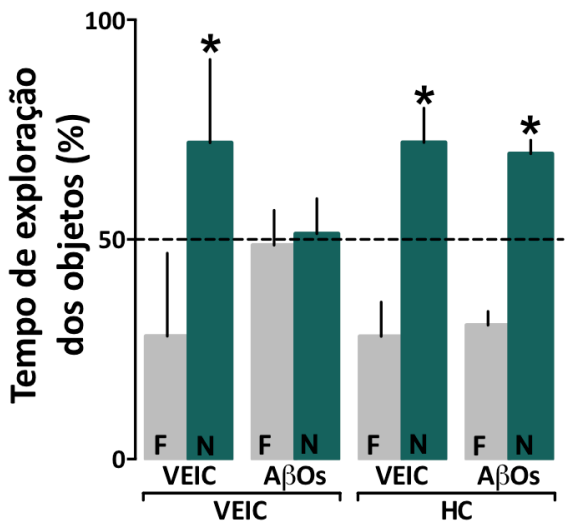


**Figura 43. Comparação do déficit comportamental induzido por diferentes preparações de A $\beta$ Os e característico de animais transgênicos.** O teste do reconhecimento de objetos (RO) foi realizado 14 dias após o tratamento com (A) A $\beta$ Os<sub>40</sub> (400 pmol/sítio) ou com (B) A $\beta$ Os<sub>42</sub> (10 pmol/sítio), ou os seus respectivos veículo (VEIC); ou realizado em (C) camundongos *wild-type* (WT) e transgênicos (TG) 5xFAD (7 meses de idade). Os gráficos representam a porcentagem do tempo de exploração do objeto familiar (F) e do objeto novo (N), em relação ao tempo total de exploração dos objetos. Os valores são expressados como a média + E.P.M.; \* $p \leq 0,05$  comparado ao objeto F do respectivo grupo; teste *t* Student; (VEIC e A $\beta$ Os<sub>40</sub>,  $n = 12$ ; VEIC e A $\beta$ Os<sub>42</sub>,  $n = 5$ ; WT,  $n = 6$ ; TG,  $n = 8$ )

Na Figura 44 é apresentado o efeito do tratamento com o HC, antagonista do receptor TRPA1, sobre o deficit de memória induzido por injeção de A $\beta$ Os<sub>40</sub>. Destaca-se que este protocolo difere do protocolo agudo apresentado no item 4.6. No protocolo anterior, os animais receberam uma única injeção i.c.v. do antagonista HC 3  $\mu$ M/sítio, 30 min antes de receberem a injeção i.c.v. de A $\beta$ Os, e foram testados no RO 14 dias após estas manipulações farmacológicas. Neste protocolo, os animais receberam uma injeção i.c.v. de A $\beta$ Os<sub>40</sub> ou de VEIC e após 14 dias foram testados no RO para averiguar o comportamento. Em seguida, foram divididos em grupos e iniciaram-se os tratamentos com VEIC ou com HC 20 mg/kg, por via oral (v.o.), uma vez ao dia, durante 14 dias. Ao final do tratamento, ou seja, 28 dias após administração dos i.c.v. de A $\beta$ Os e 14 dias após o tratamento com HC, os animais foram retestados no RO. Após 28 dias, a diferença comportamental entre controles (VEIC/VEIC) e animais injetados com A $\beta$ Os permanece (A $\beta$ Os/VEIC), como pode ser observado na comparação entre os objetos familiar (F; barras cinzas) e novo (N; barras verdes) (Fig. 44). O resultado promissor é observado nos grupos que receberam tratamento com HC. O tratamento *per se* não prejudica a performance dos animais, como pode ser notado no grupo VEIC/HC, ao passo que, o tratamento com HC promoveu uma melhora comportamental significativa dos animais que receberam A $\beta$ Os (A $\beta$ Os/HC) (Fig. 44). Este foi um primeiro indício de que o antagonismo do receptor TRPA1 poderia ser uma alternativa como tratamento. Um experimento independente foi realizado, utilizando animais *Swiss* sadios adultos, que foram tratados durante 60 dias com com VEIC ou com HC 20 mg/kg, v.o., uma vez ao dia, para avaliação da toxicidade do composto. Os animais foram testados no campo aberto e



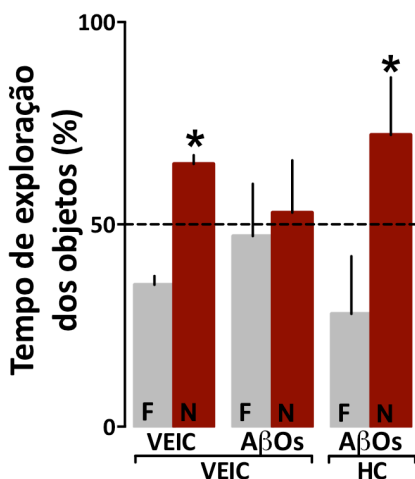
após a decapitação, a avaliação macroscópica de órgãos como o fígado, rins, intestinos e coração foi realizada. Nenhum sinal de alteração comportamental ou toxicidade orgânica foi encontrado (dados não mostrados).



**Figura 44. O efeito do tratamento com o antagonista do receptor TRPA1 sobre o déficit cognitivo induzido por AβOs<sub>40</sub> em camundongos Swiss.** O teste do reconhecimento de objetos (RO) foi realizado 28 dias após a administração de veículo (VEIC) ou AβOs<sub>40</sub> (400 pmol/sítio). Os animais receberam VEIC ou AβOs<sub>40</sub> (400 pmol/sítio) e após 14 dias iniciaram-se os tratamentos com VEIC ou HC030031 (HC) (antagonista TRPA1; 20 mg/kg, v.o., uma vez ao dia) durante 14 dias. O gráfico representa a porcentagem do tempo de exploração do objeto familiar (F) e do objeto novo (N), em relação ao tempo total de exploração dos objetos. Os valores estão expressos como a média + E.P.M; \* $p \leq 0,05$  comparado ao objeto F do respectivo grupo; teste *t* Student; (n= 6 animais por grupo).

A Figura 45 ilustra o gráfico obtido com a análise do comportamento no RO para os animais que receberam injeção i.c.v. de AβOs<sub>42</sub> e foram tratados com

HC, em um esquema idêntico ao proposto no experimento acima descrito. Resultados muito parecidos foram observados, animais controles (VEIC/VEIC) preferem explorar o objeto novo (N; barras vermelhas) em comparação ao objeto familiar (N; barras cinzas), enquanto que, animais que receberam A $\beta$ Os<sub>42</sub> (A $\beta$ Os/VEIC) não apresentam preferência por um ou outro objeto. Corroborando o resultado anterior, o tratamento com HC durante 14 dias, provoca melhorias em relação aos déficits comportamentais induzidos por A $\beta$ Os<sub>42</sub>.

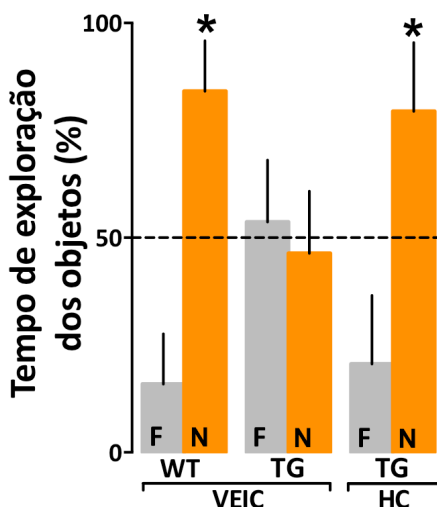


**Figura 45. O efeito do tratamento com o antagonista do receptor TRPA1 sobre o déficit cognitivo induzido por A $\beta$ Os<sub>42</sub> em camundongos Swiss.** O teste do reconhecimento de objetos (RO) foi realizado 28 dias após a administração de veículo (VEIC) ou A $\beta$ Os<sub>42</sub> (10 pmol/sítio). Os animais receberam VEIC ou A $\beta$ Os<sub>42</sub> (10 pmol/sítio) e após 14 dias iniciaram-se os tratamentos com VEIC ou HC030031 (HC) (antagonista TRPA1; 20 mg/kg, v.o., uma vez ao dia) durante 14 dias. O gráfico representa a porcentagem do tempo de exploração do objeto familiar (F) e do objeto novo (N), em relação ao tempo total de exploração dos objetos. Os valores estão expressos como a média + E.P.M; \* $p \leq 0,05$  comparado ao objeto F do respectivo grupo; teste  $t$  Student; (n= 5 animais por grupo).

Embora os resultados utilizando oligômeros provenientes de ambas as sequências de A $\beta$  fossem consistentes, este modelo não é o que melhor mimetiza a patologia em humanos. Por esta razão, o experimento seguinte foi traçado para averiguar a capacidade do antagonista HC de reverter os déficits já instalados em um modelo animal transgênico da DA. O gráfico demonstrado na Figura 46 permite-nos notar o efeito do tratamento crônico com HC ou com VEIC em animais 5xFAD TG ou WT. Neste protocolo, o tratamento com VEIC ou HC foi procedido por 60 dias, 20 mg/kg, v.o., uma vez ao dia. Os animais 5xFAD TG ou WT tinham 7 meses de idade quando os tratamentos foram iniciados. Como mencionado anteriormente, nesta idade os animais já apresentam intensa produção de A $\beta$ Os e acúmulo de placas fibrilares de A $\beta$ . Ainda, apresentam déficit cognitivo (Fig. 43). Aos 9 meses de idade – após 60 dias de tratamento com HC – os animais foram testados no RO para avaliação comportamental. Mais uma vez, em comparação ao gráfico apresentado na Figura 43, os animais controles (WT/VEIC) e transgênicos (TG/VEIC) mantiveram padrões parecidos de comportamento, indicando cognição intacta para os animais controles e prejuízo para os animais TG (Fig. 46), na comparação de exploração dos objetos familiar (F; barras cinzas) e novo (N; barras amarelas). Observa-se que, os animais TG que foram tratados com HC durante 60 dias (TG/HC), apresentaram expressiva melhora nos padrões comportamentais, quando comparados ao grupo TG/VEIC. A performance comportamental destes animais assemelha-se a observada para os animais controles (Fig. 46). Para todos os testes comportamentais realizados no RO, os dados do teste do campo aberto – provenientes da primeira sessão de habituação – foram avaliados, e as

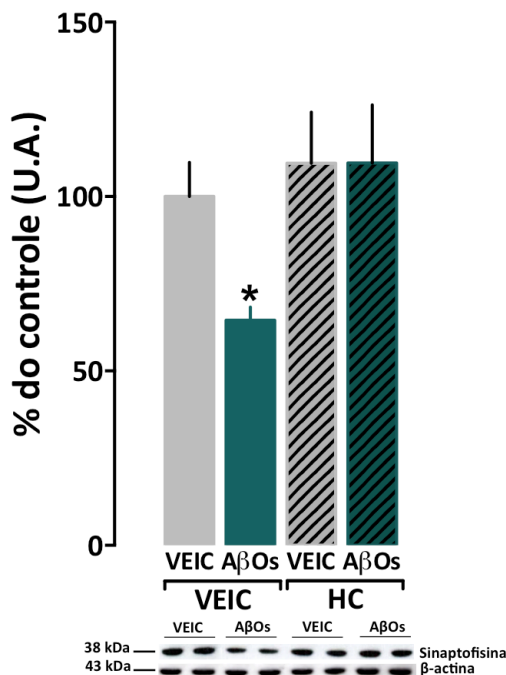
possíveis alterações locomotoras e exploratórias que poderiam interferir na análise comportamental foram excluídas (dados não mostrados).

O conjunto de resultados deste bloco permite inferir que o receptor TRPA1 pode ser um alvo para possíveis manipulações farmacológicas que visem melhorar os sintomas relacionados à memória na DA.



**Figura 46. O efeito do tratamento com o antagonista do receptor TRPA1 sobre o déficit cognitivo de camundongos transgênicos 5x*FAD*.** O teste do reconhecimento de objetos (RO) foi realizado com os camundongos *wild-type* (WT) e camundongos transgênicos (TG) 5x*FAD* aos 9 meses de idade. Os tratamentos com veículo (VEIC) ou HC030031 (antagonista TRPA1; 20 mg/kg, v.o., uma vez ao dia) iniciaram-se aos 7 meses de idade e tiveram duração de 60 dias e avaliados. O gráfico representa a porcentagem do tempo de exploração do objeto familiar (F) e do objeto novo (N), em relação ao tempo total de exploração dos objetos. Os valores estão expressos como a média + E.P.M; \* $p \leq 0,05$  comparado ao objeto F do respectivo grupo; teste *t* Student; (WT/VEIC,  $n = 5$ ; TG/VEIC,  $n = 7$ ; TG/HC,  $n = 5$ ).

Após a realização dos testes comportamentais descritos acima, deste grupo de experimentos, os cérebros dos animais foram coletados, de acordo com o previsto para cada metodologia de biologia molecular a ser realizada. Os resultados são apresentados na sequência. Na Figura 47 está apresentado o gráfico da quantificação da imunodeteção para sinaptofisina no hipocampo, seguido das bandas representativas, para cada grupo experimental. É possível observar que os animais que receberam injeção i.c.v. de A $\beta$ Os<sub>40</sub> e que foram tratados apenas com VEIC (A $\beta$ Os/VEIC) apresentaram uma diminuição na expressão da proteína pré-sináptica sinaptofisina, quando comparados aos animais controles (VEIC/VEIC). Já os animais que receberam injeção de A $\beta$ Os<sub>40</sub> e foram tratados com HC apresentaram aumento expressivo na expressão de sinaptofisina no hipocampo quando comparados aos animais do grupo A $\beta$ Os/VEIC (Fig. 47). O tratamento dos animais com HC *per se* não promoveu nenhuma alteração nos níveis desta proteína, como indicado por níveis de expressão similares ao do grupo controle.



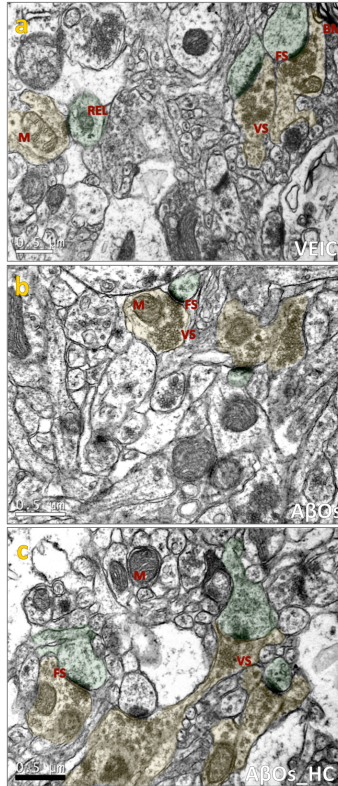
**Figura 47. O efeito do tratamento com o antagonista do receptor TRPA1 sobre o dano sináptico induzido por AβOs<sub>40</sub> em camundongos Swiss.** Representação gráfica da expressão de sinaptofisina e imagens representativas das bandas obtidas por *western blotting* para a proteína sinaptofisina (38 kDa) e para β-actina (43 kDa) no hipocampo de camundongos Swiss foram injetados com VEIC ou AβOs<sub>40</sub> (400 pmol) e tratados com VEIC ou HC030031 (HC, 20mg/kg, v.o., uma vez ao dia); VEIC= veículo. Os dados são representados como média + E.P.M da razão Sinaptofisina/β-actina, e expressos como porcentagem do grupo controle (VEIC/VEIC). \* $p \leq 0,05$  comparado ao grupo VEIC/VEIC; U.A.= unidades arbitrárias. ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc Newman-Keuls*. Os gráficos representam a análise de 2 experimentos independentes; n= 6 animais por grupo.

De acordo com o exposto acima e na mesma orientação, é possível observar nas imagens representativas da Figura 48 e 49 as espinhas

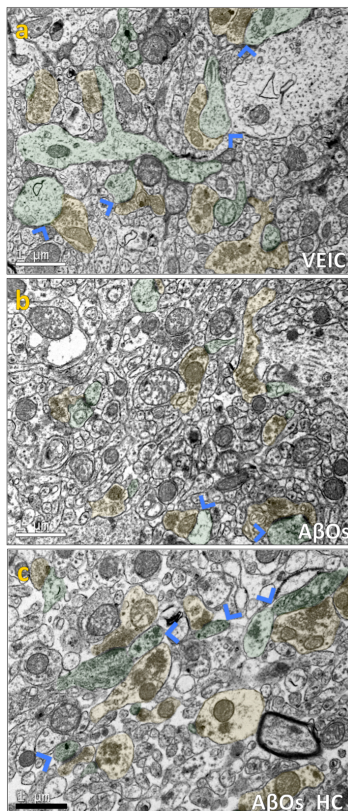
dendríticas no hipocampo – dos animais que receberam injeção i.c.v. de VEIC ou de A $\beta$ Os<sub>42</sub> e que foram tratados com HC ou VEIC – através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET). As análises por MET permitem uma avaliação com riqueza de detalhes. Podem ser observados nas imagens, dependendo do aumento utilizado, terminais pré-sinápticos, pós-sinápticos, células da glia, núcleos celulares neuronais e axônios recobertos por bainha de mielina. Além destes, estruturas intracelulares importantes, como por exemplo, o retículo endoplasmático liso (REL), os microtúbulos, as vesículas sinápticas e as mitocôndrias. Nas imagens da Figura 48 estão apontados terminais pré- sinápticos axonais – contendo mitocôndria e vesículas sinápticas – que foram destacados pelos sombreados amarelos e terminais pós-sinápticos dendríticos contendo REL, que foram destacados em verde. As regiões escuras entre os terminais caracterizam a fenda sináptica, e apresentam-se nesta coloração, devido ao fato de conterem muitos neurotransmissores, uma região muito eletrondensa. As imagens apresentam uma fotomicrografia representativa de cada grupo no aumento de 40.000 vezes (Fig. 48). Nas imagens representativas da Figura 49 – um exemplo de cada grupo experimental – estão destacadas, utilizando os mesmos sombreados, algumas das sinapses encontradas no campo de menor aumento (20.000 vezes). Adicionalmente, apontadas por setas azuis estão as espinhas dendríticas – sombreados em verde – em formato de cogumelo (do inglês, *mushroom*) (Fig. 49). Estas foram distinguidas das demais pelo formato e pela extensão da cabeça (do inglês, *spine head*). Para ser considerada uma espinha cogumelo a cabeça deve ser de tamanho  $\geq 600$  nm. As análises foram realizadas com auxílio do programa Image J<sup>®</sup>. Foram capturadas 5 imagens de 4 quadrantes diferentes

para cada animal de cada grupo experimental. Os grupos experimentais eram formados por 3 animais. O número de sinapses totais e de sinapses cogumelos foi contado em cada imagem, por um avaliador, de forma cega para o tratamento, e os gráficos desta quantificação podem ser observados na Figura 50. Em relação ao número de sinapses totais, é possível notar que a injeção i.c.v. de A $\beta$ Os<sub>42</sub> induziu uma tênue redução (barras vermelhas), em comparação com o número de sinapses totais dos animais controles (VEIC) (Fig. 50A). O tratamento com o antagonista do receptor TRPA1 (barras vermelhas hachuradas), o HC030031, induziu um aumento no número de sinapses totais, para níveis comparáveis ao observado para os animais VEIC/VEIC (barras cinzas) (Fig. 50A). Com relação ao número de sinapses do tipo cogumelo o resultado é ainda mais marcante. Observa-se que a injeção i.c.v. de A $\beta$ Os<sub>42</sub> provoca diminuição acentuada (aprox. 60 %) do número de sinapses deste tipo, quando comparamos os resultados deste grupo aos dos obtidos na contagem dos animais VEIC (Fig. 50B). O bloqueio dos receptores TRPA1, através do tratamento com o HC, promoveu uma melhora significativa, evidenciada pelo aumento no número de sinapses cogumelo neste grupo (Fig. 50B).

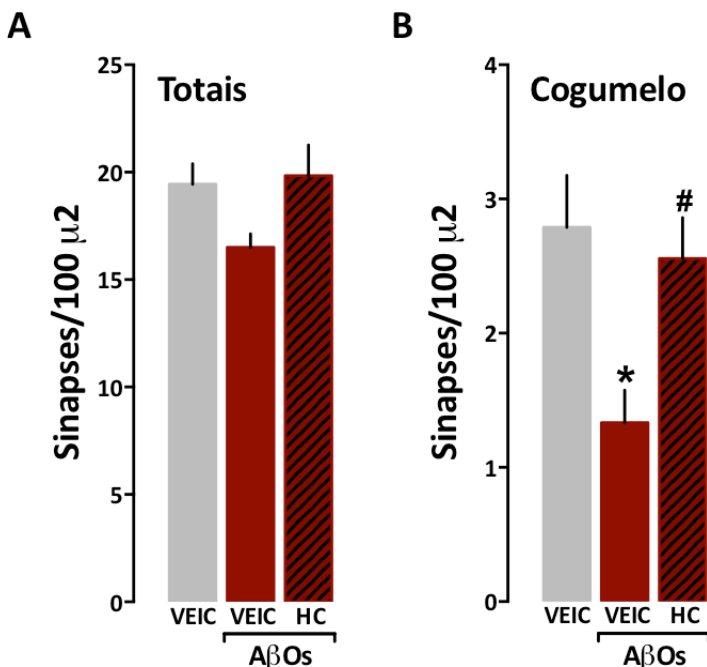




**Figura 48. O efeito do tratamento com o antagonista do receptor *TRPA1* sobre o dano sináptico induzido por  $A\beta Os_{42}$  em hipocampo de camundongos Swiss.** Os camundongos Swiss receberam injeção i.c.v. de veículo (VEIC) ou de  $A\beta Os_{42}$  (10 pmol/sítio) e posteriormente foram tratados com veículo (VEIC) ou HC030031 (HC, antagonista *TRPA1*; 20 mg/kg, v.o., uma vez ao dia) durante 14 dias. Imagens representativas das fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) evidenciando as sinapses no hipocampo. Os terminais pré-sinápticos contêm VS e M, e estão sombreados em amarelo. Os terminais pós-sinápticos contêm REL e estão sombreados em verde. M= mitocôndria; REL= retículo endoplasmático liso; VS= vesícula sináptica; FS= fenda sináptica; BM= bainha de mielina. Foram analisadas 5 fotomicrografias de 4 quadrantes diferentes para cada animal; n= 3 animais por grupo. As imagens foram capturadas utilizando microscópio eletrônico de transmissão, em um aumento de 40.000x. Escala= 0.5  $\mu m$ .



**Figura 49. O efeito do tratamento com HC030031 sobre o dano sináptico induzido por A $\beta$ O<sub>42</sub> em hipocampo de camundongos Swiss.** Os camundongos Swiss receberam injeção i.c.v. de veículo (VEIC) ou de A $\beta$ O<sub>42</sub> (10 pmol/sítio) e posteriormente foram tratados com veículo (VEIC) ou HC030031 (HC, antagonista TRPA1; 20 mg/kg, v.o., uma vez ao dia) durante 14 dias. Imagens representativas das fotomicrografias obtidas por MET de fatias do hipocampo. Os terminais pré-sinápticos estão sombreados em amarelo e os terminais pós-sinápticos estão sombreados em verde. As setas azuis indicam espinhas dendríticas em formato de cogumelo,  $\geq 600$  nm. Foram analisadas 5 fotomicrografias de 4 quadrantes diferentes para cada animal; n= 3 animais por grupo. As imagens foram capturadas utilizando microscópio eletrônico de transmissão, em um aumento de 20.000x. Escala= 1  $\mu$ m.

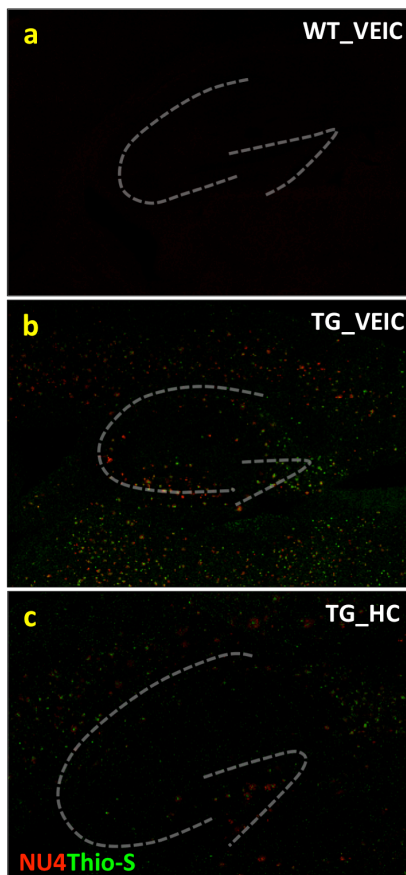


**Figura 50. O tratamento com HC030031 exerce efeito benéfico sobre o dano sináptico induzido por A $\beta$ Os<sub>42</sub>.** Camundongos Swiss receberam injeção i.c.v. de veículo (VEIC) ou A $\beta$ Os<sub>42</sub> (10 pmol/sítio). Posteriormente, os animais foram tratados com veículo (VEIC) ou HC030031 (HC, antagonista TRPA1; 20 mg/kg, v.o., uma vez ao dia) durante 14 dias. Representações gráficas do número de sinapses (A) totais e do número de sinapses (B) em formato de cogumelo nas fotomicrografias do hipocampo obtidas por MET. Os dados são representados como média + E.P.M do número de sinapses em uma área de 100  $\mu^2$ . \* $p \leq 0,05$  comparado ao grupo VEIC; # $p \leq 0,05$  comparado ao grupo A $\beta$ Os; U.A.= unidades arbitrárias. ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* Newman-Keuls; (n = 3 animais por grupo).

Avaliados em conjunto, estes resultados indicam que os oligômeros de A $\beta$  prejudicam as sinapses, uma vez que são capazes de reduzir o número tanto de terminais pré-sinápticos quanto de terminais pós-

sinápticos. Destacadamente, o tratamento com o HC030031, atenuou de maneira significativa, ambos os efeitos induzidos pelos A $\beta$ Os. Pode ser sugerido ainda, com base nestes resultados, que o antagonismo do receptor TRPA1 produz efeito benéfico sobre as sinapses.

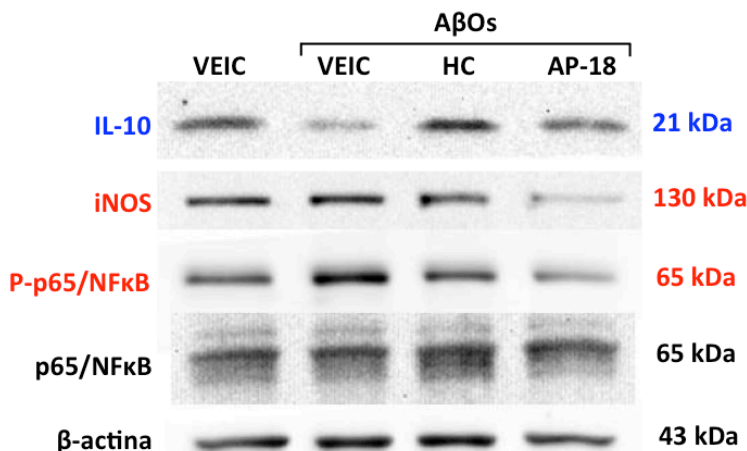
Ademais, quando avaliados os encéfalos dos animais 5xFAD TG resultados promissores foram também encontrados, e estes são apresentados na Figura 51. As imagens são representativas de um animal de cada grupo, e foram capturadas na função *tilescan* na microscopia confocal. Ao usar esta ferramenta, é possível observar nas imagens a formação hipocampal (destacada em linhas pontilhadas brancas) na sua totalidade, uma parte do córtex subsequente a esta região, uma parte do hipotálamo, e uma parte do cerebelo. As análises de imunofluorescência para os A $\beta$ Os seguida de contracoloração com Thio-S, para marcação das placas fibrilares de A $\beta$  revelaram – como mostrado anteriormente nos encéfalos dos animais de 7 meses de idade – intensa marcação para ambos no cérebro dos animais TG de 9 meses. Da mesma maneira, nenhuma marcação foi encontrada nas fatias de encéfalo dos animais WT (Fig. 51). O fato mais impressionante foi observado nas fatias dos encéfalos dos animais 5xFAD TG tratados por 60 dias com HC030031, nos quais se observou uma drástica redução de placas fibrilares de A $\beta$  (verde) e também de A $\beta$ Os (vermelho). Para este último, a redução foi especialmente acentuada na formação hipocampal (Fig. 51).



**Figura 51. O efeito do tratamento com o antagonista do receptor *TRPA1* sobre os  $A\beta O_{42}$  e as placas de  $A\beta$  no encéfalo de camundongos transgênicos *5xFAD*.** Os camundongos transgênicos (TG) *5xFAD* foram tratados durante 60 dias com veículo (VEIC) ou HC030031 (HC, antagonista *TRPA1*; 20 mg/kg, v.o., uma vez ao dia). Imagens representativas da marcação por imunofluorescência para os  $A\beta$ Os (NU4; vermelho) e para as placas fibrilares de  $A\beta$  por contracoloração com Tioflavina-S (Thio-s; verde) no encéfalo de camundongos *wild-type* (WT) e de camundongos *5xFAD* TG (9 meses de idade). O tracejado (branco) representa a localização da formação hipocampal. Foram analisadas 2 imagens de 2 fatias diferentes para cada animal; n= 3 animais por grupo. As imagens foram capturadas utilizando microscópio confocal na função *tilesan*.

Este último resultado ressaltou mais um possível efeito benéfico do tratamento com HC030031, um antagonista do TRPA1. A fim de tentar desvendar por quais possíveis mecanismos estes efeitos benéficos estariam acontecendo, foi levantada uma última hipótese. Os fatos são intrigantes, uma vez que os efeitos benéficos aparecem mesmo após longos períodos de exposição dos encéfalos aos A $\beta$ Os. A proposta foi de que, a ação benéfica do antagonista seria muito mais dependente da ação do bloqueio do receptor TRPA1 na microglia do que no neurônio. Neste sentido, o bloqueio do receptor TRPA1 induziria uma mudança de fenótipo microglial de inflamatório (M1) para anti-inflamatório (M2). A etapa inicial para responder esta pergunta consistiu na realização de um experimento em cultura de células microgliais que foram expostas ao VEIC ou aos A $\beta$ Os<sub>42</sub>, e, em seguida, foram tratadas com VEIC ou com HC030031, ou ainda com AP-18, um outro antagonista TRPA1. Marcadores pró- e anti-inflamatórios foram avaliados por *Western blotting* e os resultados são mostrados, em legendas vermelhas e azuis, respectivamente, na Figura 52. Primeiramente, é possível verificar a possível capacidade dos A $\beta$ Os de induzir um fenótipo M1, quando comparadas às células microgliais que receberam VEIC. Esta evidência é demonstrada por aumento de expressão de iNOS, e de ativação do fator de transcrição p-65/NF $\kappa$ B, tipicamente pró-inflamatórios (Fig. 52; legendas vermelhas). Além disso, foi observado baixo nível de expressão de IL-10, caracteristicamente uma citocina anti-inflamatória (Fig. 52; legenda azul). O tratamento das células, que foram expostas aos A $\beta$ Os, com ambos os antagonistas do receptor TRPA1 – o HC e o AP-18 – induziu um perfil microglial totalmente oposto. As células apresentam expressão de proteínas que indicam compatibilidade com

um perfil M2, ou anti-inflamatório. Isto pode ser visualizado pelo abrandamento da fosforilação da proteína p-65/NFκB e atenuação dos níveis de expressão de iNOS, ao passo que, os níveis de IL-10 apresentam-se elevados (Fig. 52). Este resultado preliminar pode indicar uma possível alteração de fenótipo microglial induzida pelos antagonistas do TRPA1, porém, outros experimentos utilizando diferentes abordagens, como a diferenciação celular por citometria de fluxo e a dosagem de citocinas, tanto *in vitro* como *ex vivo*, são necessários para que afirmações mais concretas sejam inferidas.



**Figura 52. O efeito do tratamento com antagonistas do receptor TRPA1 sobre a expressão de marcadores pró- e anti-inflamatórios em células microgliais.** As células microgliais de cultura primária do córtex de ratos (15 DIV), foram expostas ao VEIC ou aos AβOs<sub>42</sub> (500 nM) e 30 min depois foram tratadas com VEIC, HC030031 (HC; 0,03 μM) ou AP-18 (0,03 μM). Imagens representativas das bandas obtidas por imunodeteção para a IL-10= Interleucina 10, citocina anti-inflamatória (21 kDa); iNOS= enzima óxido nítrico sintetase induzida (130 kDa); P-p65/NFκB= fator de transcrição p-65/NFκB fosforilado e p65/NFκB= fator de transcrição p-65/NFκB (65 kDa); β-actina (43 kDa). VEIC= veículo; HC030031= antagonista TRPA1; AP-18= antagonista TRPA1. Foram realizados dois experimentos independentes, n= 2 amostras por grupo, em duplicata

O resumo dos dados apresentados nesta última etapa de experimentos é exposto na Tabela 6.



**Tabela 6. Sumário dos resultados sobre os efeitos benéficos do antagonismo do receptor TRPA1 em modelos experimentais relacionados à DA**

Sumário de Resultados - 6	
Descrição	Resultado
Déficit cognitivo induzido por A $\beta$ O <sub>s<sub>40</sub></sub> , A $\beta$ O <sub>s<sub>42</sub></sub> e em animais 5xFAD	✓
Efeito do tratamento oral e diário com HC030031 (14 dias) sobre o déficit cognitivo induzido por A $\beta$ O <sub>s<sub>40</sub></sub> e A $\beta$ O <sub>s<sub>42</sub></sub>	➔
Efeito do tratamento oral e diário com HC030031 (60 dias) sobre o déficit cognitivo característico do modelo transgênico 5xFAD	➔
Efeito do tratamento oral e diário com HC030031 (14 dias) sobre a perda sináptica induzida por A $\beta$ O <sub>s<sub>40</sub></sub> e A $\beta$ O <sub>s<sub>42</sub></sub>	➔
Efeito do tratamento oral e diário com HC030031 (60 dias) sobre a formação/acúmulo de placas e de oligômeros de A $\beta$ nos animais 5xFAD	➔
Efeito dos A $\beta$ O <sub>s</sub> e do HC030031 sobre a mudança de fenótipo das células microgliais	✓

➔ = DIMINUI    ✓ = SIM



## 4. DISCUSSÃO

O receptor TRPA1 é um canal catiônico não-seletivo presente no sistema nervoso central (SNC) onde é expresso em neurônios da medula espinhal e nos gânglios da raiz dorsal (BARABAS; KOSSYREVA; STUCKY, 2012; KIM, Y S *et al.*, 2010; VANDEWAUW; OWSIANIK; VOETS, 2013). Entretanto, não há evidência concreta na literatura da sua expressão em estruturas superiores como o encéfalo. Neste aspecto, grande parte dos trabalhos versa sobre a participação do TRPA1 em processos inflamatórios e dolorosos, de diferentes naturezas (ANDRADE *et al.*, 2011; AVENALI *et al.*, 2014; BRIERLEY *et al.*, 2011; DA COSTA *et al.*, 2010; DAI *et al.*, 2007; DEL CAMINO *et al.*, 2010; KWAN *et al.*, 2006; NEELY *et al.*, 2011; OBATA *et al.*, 2005). Ao hipotetizarmos que o TRPA1 poderia estar envolvido na iniciação e na progressão da DA, tornou-se mandatória a análise de sua expressão no encéfalo. Neste trabalho, foi avaliada, pela primeira vez, a expressão deste receptor em estruturas como o hipocampo e o córtex, nos principais tipos celulares. Estas estruturas ou regiões encefálicas são cruciais para a patologia da DA. É amplamente descrito o processo de comprometimento destas regiões durante a progressão da DA, e que o principal sintoma da doença a perda da memória, é resultante destas modificações (FJELL *et al.*, 2014; HOPPER; VOGEL, 1976; SHEFER, 1977). Os resultados aqui apresentados mostraram que o receptor TRPA1 está expresso em células neuronais do hipocampo de ratos. Ademais, foi demonstrado que o TRPA1 está expresso, mais especificamente, nas sinapses neuronais, regiões cruciais para a interação entre neurotransmissores e seus receptores, nas quais este receptor poderia desempenhar um importante papel

como modulador. Em relação a esta análise, evidenciou-se a presença de TRPA1 em sinaptossomas do córtex de ratos, através da técnica de *Western blotting*, o que resultou no aparecimento de 4 bandas majoritárias. Estas quatro bandas parecem ser uma característica dos receptores TRP, uma vez que um padrão similar já foi demonstrado para o TRPV1 no encéfalo de ratos (TÓTH *et al.*, 2005). Também foi mostrado que o TRPA1 é expresso normalmente por células microgliais. Neste contexto, na periferia, mais precisamente em macrófagos peritoneais, foi sugerida a expressão de TRPA1, através de experimentos funcionais, utilizando agonistas e antagonistas (ROMANO *et al.*, 2013). Evidentemente, por apresentarem características funcionais e genéticas muito parecidas – descendem de um mesmo progenitor – a microglia é considerada o macrófago do SNC (ROCK *et al.*, 2004). Uma outra evidência importante aqui reportada foi a ausência do receptor TRPA1 em células astrocitárias. Contrapondo este achado, um estudo demonstrou que a atividade do receptor TRPA1 parecia contribuir para a recuperação do cálcio intracelular em astrócitos, provenientes do hipocampo (SHIGETOMI *et al.*, 2012). Embora esteja implícita a expressão de TRPA1 em astrócitos, este é um dado funcional, pois nenhuma evidência acerca da expressão de RNAm ou de proteína foi mostrada neste estudo. Ademais, os ensaios realizados utilizaram uma alta concentração (40  $\mu$ m) do antagonista do TRPA1, o HC030031, o que poderia desencadear uma ação deste antagonista em outros alvos, por perda de sua seletividade.

O composto HC030031 – 2-(1,3-dimetil-2,6-dioxi-1,2,3,6-tetraidropurina-7-alil)-N-[4-(propa-2-il]fenil) acetamida – é o antagonista do receptor TRPA1 mais amplamente utilizado nos diversos estudos publicados

na literatura, e também em estudos pré-clínicos (VIANA; FERRER-MONTIEL, 2009). Deste modo, foi o composto escolhido, para a realização da maioria dos experimentos aqui relatados. Embora o HC, como também é abreviado, não seja o antagonista mais potente do receptor TRPA1, parece ser bastante seletivo. De fato, a seletividade deste composto para o receptor TRPA1 foi testada e demonstrada previamente (EID *et al.*, 2008). Neste trabalho, os autores analisaram a ligação do HC a diferentes receptores, utilizando ensaios de *binding* de inibição e ensaios enzimáticos. Observou-se que, na concentração de 10  $\mu\text{M}$  (considerada uma concentração elevada), em diferentes tecidos, este antagonista parece interferir minimamente (inibição entre 25 – 45 %) com a enzima nNOS, a proteína IKK-2, transportadores de monoaminas, canal de sódio do tipo 2 e ainda CB<sub>2</sub>, em uma lista de 48 alvos testados. Ou seja, em concentrações superiores a 10  $\mu\text{M}$  ocorre, muito provavelmente, perda de especificidade pelo alvo. Em concentrações menores que esta, o antagonista parece apresentar alta seletividade para o TRPA1. Para a realização dos experimentos deste trabalho foi empregada a concentração de 0,03  $\mu\text{M}$  para os ensaios *in vitro* e, a dose de 3  $\mu\text{M}$ /sítio ou 9  $\mu\text{M}$  para os ensaios *in vivo*. Estes valores foram determinados através de cálculo de extrapolação, com base em um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa (DA COSTA *et al.*, 2010), e posterior curva concentração-resposta *in vitro* (dados não mostrados).

A capacidade dos A $\beta$ Os em induzirem alterações oxidativas e inflamatórias é bem descrita na literatura, (para revisão ver AGOSTINHO; CUNHA; OLIVEIRA, 2010; VIOLA; KLEIN, 2015). Marcadores distintos do processo de estresse oxidativo já foram avaliados em diferentes modelos experimentais (DE FELICE *et al.*,

2007; JANG *et al.*, 2007; PORCELLOTTI *et al.*, 2015). Em adição, está bem estabelecido que a formação excessiva de EROS é um fator determinante neste processo (EMERIT; EDEAS; BRICAIRE, 2004). Ainda, diversos fatores podem contribuir para a maior produção de EROS. Dentre eles as alterações deletérias na via mitocondrial aparecem como um elemento em destaque (CASPERSEN *et al.*, 2005). De fato, a mitocôndria é considerada a maior fonte endógena de EROS (CADENAS; DAVIES, 2000). Hashimoto e colaboradores (2003) propuseram, em uma revisão, um papel chave para a mitocôndria na progressão de doenças neurodegenerativas, como a DA. Em humanos, foi sugerida uma função crucial de A $\beta$  para a formação e o acúmulo de radicais livres, que por sua vez estariam contribuindo para o processo de estresse oxidativo durante a progressão da DA. Esta proposição foi feita a partir de evidências de marcadores de estresse oxidativo em regiões encefálicas que continham também marcadores fisiopatológicos da DA, e que são afetadas no decorrer da doença (HENSLEY *et al.*, 1995). O estresse oxidativo é um processo complexo que depende de uma combinação de diversos eventos celulares, tais como: dano mitocondrial, formação e acúmulo de EROS, hiperativação de enzimas oxidativas e função diminuída de enzimas antioxidantes, peroxidação de lipídeos, oxidação de proteínas, glicação de endoprodutos e oxidação do DNA, (para revisão ver SULTANA; BUTTERFIELD, 2009). Aqui foram avaliados fatores pontuais que podem ser uma indicação de estresse oxidativo no modelo de DA empregado. Os resultados mostram que os A $\beta$ Os, de ambas as sequências 1-40 e 1-42, induzem tanto a disrupção do potencial de membrana mitocondrial (PMM), quanto a formação excessiva de EROS, indicando a habilidade dos A $\beta$ Os de

causar estresse oxidativo neuronal. Estes achados não são inéditos, visto que já foi demonstrada anteriormente a capacidade dos A $\beta$ Os de induzirem alterações oxidativas (BICCA *et al.*, 2011; DE FELICE *et al.*, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 2011; MEDEIROS *et al.*, 2007). A originalidade aqui relatada foi a habilidade do antagonista do receptor TRPA1, o HC030031, em bloquear estes efeitos deletérios – mitocondriais e de formação de EROS – estimulados pelos A $\beta$ Os, sugerindo que o receptor TRPA1 participa do processo de indução de toxicidade iniciado por A $\beta$ Os. Destaca-se que o AP-18, outro antagonista do TRPA1 mais potente, também foi utilizado nos testes, para fins de comparação, e os mesmos efeitos foram observados (dados não mostrados). Efeitos similares já foram descritos com antagonistas do receptor NMDA (BICCA *et al.*, 2011; DE FELICE *et al.*, 2007), que assim como o TRPA1 – salvas as suas importantes diferenças anatômicas, funcionais e de expressão – também é um canal iônico. Os receptores NMDA são um importante e amplamente estudado alvo para os A $\beta$ Os, amplamente estudados, para os quais, existe um fármaco aprovado para o tratamento da DA (DESAI; GROSSBERG, 2005). Neste sentido, o TRPA1 poderia despontar como um potencial novo alvo para os A $\beta$ Os.

Após a exposição a intenso estresse oxidativo ou presença de processo inflamatório é comum que as células entre em processo de morte (JANSSEN *et al.*, 1993). Os A $\beta$ Os são capazes de provocar a morte neuronal por consequência da exacerbada toxicidade produzida após ligarem-se ao neurônios (DE FELICE *et al.*, 2008; FIFRE *et al.*, 2006; LAMBERT *et al.*, 1998). No presente trabalho foi mostrado que os A $\beta$ Os induzem morte neuronal, sinalizada pela incorporação do PI. De forma similar, os resultados aqui exibidos indicam que o

agonista do receptor TRPA1, o cinamaldeído (CNH), induz morte neuronal, e que o seu antagonista, o HC, previne a morte celular induzida por AβOs. A interpretação deste conjunto de resultados fornece subsídio para sugerir que, os AβOs requerem ativação de TRPA1 para indução da toxicidade, como aumento da produção de EROS e dano mitocondrial, e consequente morte neuronal. De fato a morte neuronal promovida por AβOs como consequência da formação de EROS já foi relatada (SPONNE *et al.*, 2003). Ademais, o fato do receptor TRPA1 ser um canal iônico permeável ao íon cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (VENKATACHALAM; MONTELL, 2007) é de extrema relevância, pois sabe-se que o  $\text{Ca}^{2+}$  é um potente agente citotóxico quando presente em excesso. Na verdade, a “hipótese da excitotoxicidade” foi levantada em uma revisão de literatura, e considera que a ativação de receptores iônicos que permitem a entrada e o acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  são cruciais para a indução dos danos celulares, culminando na morte celular (SATTLER; TYMIANSKI, 2000). Além disso, o dano mitocondrial aparece como um ponto central neste ambiente de toxicidade, constituindo um estágio irreversível para célula em que a morte celular é o resultado natural frente ao estímulo tóxico (para revisão ver GALLUZZI; BLOMGREN; KROEMER, 2009).

Na tentativa de responder se estes efeitos observados com a utilização do HC030031 nas culturas primárias poderia ser resultado da interação direta deste composto com os AβOs, e não, inteiramente, do bloqueio dos receptores TRPA1 nos neurônios, foi realizada a coincubação dos AβOs com HC, além de outros controles. Em um estudo anterior, para tentar excluir esta mesma variável, utilizamos compostos diferentes – pseudopeptidérgicos e não-peptidérgicos – para avaliar os efeitos já vistos com o principal composto



peptidérgico que impedia os efeitos dos A $\beta$ Os<sub>40</sub> (BICCA *et al.*, 2015). No presente trabalho, observamos evidências de que o HC não altera diretamente a formação ou estabilização de A $\beta$ Os, o que indica que os efeitos observados anteriormente não são provenientes da interação direta entre o composto e o peptídeo. Alguns outros compostos podem interagir diretamente com A $\beta$ Os, o que também pode causar efeitos benéficos, indiretamente. A grande maioria destes são compostos aromáticos, como, por exemplo, polifenóis e quinonas (CONVERTINO *et al.*, 2009; DE FELICE *et al.*, 2004; PORAT; ABRAMOWITZ; GAZIT, 2006). Os resultados aqui apresentados indicam que o AP-18, outro antagonista do TRPA1, e o agonista CNH são capazes de promover alterações na composição de A $\beta$ Os. Os resultados relacionando a interação de HC e A $\beta$ Os, e os resultados de dano mitocondrial, formação de EROS e morte neuronal, apontam para uma cascata de eventos citotóxicos que são dependentes, ao menos em parte, da ativação de TRPA1, indicando que o TRPA1 pode ser um alvo importante para a indução da toxicidade iniciada por A $\beta$ Os, e deste modo, revelando-se como um possível receptor direto para estes oligômeros.

A especificidade anatomopatológica da DA é determinada pela ação preferencial dos A $\beta$ Os sobre o córtex e o hipocampo, regiões relacionadas à memória. Entretanto, também pode ser demonstrada e reforçada no conceito de receptor-específico, que são afetados pelos A $\beta$ Os. O primeiro trabalho que descreveu a formação e a importância dos A $\beta$ Os, caracterizando-os como toxinas essenciais para a progressão da DA, propôs também que a morte neuronal proveniente do ataque dos A $\beta$ Os às sinapses parecia ser seletiva à subpopulações específicas e vulneráveis de neurônios (LAMBERT *et al.*, 1998). O fato de que os A $\beta$ Os atacam

as sinapses e induzem toxicidade é cada vez mais reconhecido e reportado. Em uma recente revisão, na qual Ferreira e Klein (2011) descreveram que os receptores constituem os alvos primários dos A $\beta$ Os em células neuronais, foi amplamente mencionado que os A $\beta$ Os são capazes de promover alterações estruturais e funcionais nos receptores. Além disso, já foi anteriormente demonstrada que a ligação dos A $\beta$ Os às sinapses apresenta uma cinética de saturação, que é compatível com a hipótese de ligação dos A $\beta$ Os às sinapses através da interação com receptores (RENNER *et al.*, 2010).

No presente estudo foi consistentemente demonstrado, por meio de diferentes técnicas, a possível interação dos A $\beta$ Os com o TRPA1. Inicialmente, demonstramos que os A $\beta$ Os ligam-se às células neuronais imunomarcadas para o receptor TRPA1. A quantificação das imagens evidenciou uma colocalização de aproximadamente 45 %, indicando que o TRPA1 colabora para a ligação de A $\beta$ Os, mas parece não ser essencial para esta união. Esta ideia é reforçada, pela observação de que há muitos pontos nos dendritos que expressam TRPA1 mas que possuem nenhum oligômero ligado, bem como pela presença de processos dendríticos cobertos por A $\beta$ Os e que não expressam TRPA1. Nesta mesma conjectura, já foi mostrado que A $\beta$ Os atacam dendritos que expressam NMDA, porém nem todos os dendritos NMDA-positivos são vulneráveis, sugerindo que o receptor é importante, mas não essencial ou vital para a ligação dos A $\beta$ Os (DECKER *et al.*, 2010). Ainda, neste trabalho de tese, através de ensaios de coimunoprecipitação foi mostrado que TRPA1 e A $\beta$ Os estão ligados, reforçando o dado anterior. O receptor TRPA1 foi coisolado de amostras de sinaptossomas de córtex de ratos, e este evento foi

dependente da ligação de A $\beta$ Os, uma vez que não foi encontrado sinal para o TRPA1, nos sinaptossomas tratados com IgG. Adicionalmente, as amostras tratadas com A $\beta$ Os foram não apenas TRPA1 positivas, mas também PSD95 positivas. Em um estudo prévio de Renner e colaboradores (2010) foi demonstrado que os A $\beta$ Os são capazes de coimunoprecipitar com diferentes proteínas sinápticas, como o receptor mGluR5, algumas subunidades do receptor NMDA e a proteína de suporte PSD95. Neste contexto, interpretamos que a PSD95 serviu como um controle positivo neste experimento. Esta ideia também indica que é possível a interação entre TRPA1 e PSD95 ou, talvez, outras proteínas sinápticas. Jiang e colaboradores (2011) afirmaram que, por o TRPA1 apresentar um N-terminal rico em repetições de Anquirina, isto poderia ser uma evidência de que o receptor fornece substrato para a interação direta com outras moléculas. Em um outro estudo, foi observado que a ligação dos A $\beta$ Os aos dendritos neuronais ocorria em colocalização com a PSD95, em uma frequência de 95 % (LACOR *et al.*, 2004). Todos estes dados indicam em conjunto, que esta proteína poderia servir de suporte para a ligação de A $\beta$ Os aos receptores sinápticos, talvez subsidiando um complexo de receptores, que incluiria o TRPA1.

A hipótese de um complexo de receptores atuando conjuntamente para que ocorra a ligação dos A $\beta$ Os já foi manifestada anteriormente (CAETANO *et al.*, 2011; FERREIRA; KLEIN, 2011; VIOLA; KLEIN, 2015). Esta hipótese tem sido cada vez mais aceita, principalmente pelo fato de que uma variedade de receptores estão relacionados como possíveis proteínas alvo para a ligação dos A $\beta$ Os. Durante a realização do estágio doutoral sanduíche, foi realizada uma ampla revisão da literatura focando nos possíveis alvos para os

AβOs já descritos. O resultado desta revisão culminou na elaboração de uma tabela aqui apresentada (Tabela 7). Além dos dois alvos amplamente estudados – a PrPC (proteína prion celular) e o receptor NMDA – outros receptores também compõem a lista, como por exemplo, os receptores nicotínicos para acetilcolina (MAGDESIAN *et al.*, 2005), a proteína RAGE (do inglês, *Receptor for Advanced Glycation Endproducts*) (STURCHLER *et al.*, 2008), o receptor de tirosina quinase EphB<sub>2</sub> (do inglês; *Ephrin type-B receptor 2*) (CISSÉ *et al.*, 2011) e, o mais recente, a proteína LILRB2 (do inglês; *Leukocyte Immunoglobulin-like receptor subfamily B member 2*) (KIM, T *et al.*, 2013). Para tentar confirmar a hipótese de que o TRPA1 serviria como receptor alvo para os AβOs, duas diferentes metodologias foram utilizadas. Na primeira, através do ensaio de *alpha screening*, os resultados preliminares foram animadores, mostrando que o antagonista do TRPA1, HC030031, promovia redução da ligação de AβOs às sinapses, de aproximadamente 60 %. Esta metodologia, bem como compostos que bloqueiam a ligação de AβOs às sinapses, como o ATA (do inglês, *Aurin Tricarboxylic Acid*), foram recentemente descritos (WILCOX *et al.*, 2015). Porém, quando os experimentos foram repetidos e uma curva concentração-resposta foi realizada, nenhum efeito foi observado. Isto poderia indicar que além de se ligarem ao TRPA1 nas sinapses, os AβOs também ligam-se ao TRPA1 extrasináptico, e que preferencialmente esta última ligação seria mais evidente, ou ainda, talvez mais importante. Desta maneira, o segundo protocolo visou abordar a capacidade do antagonista do receptor TRPA1 bloquear a ligação dos AβOs nos dendritos neuronais, em cultura primária. Neste ensaio, foi observado que o HC inibiu a ligação de AβOs aos processos dendríticos em

aproximadamente 40 %. Neste contexto, um receptor muito estudado é o receptor NMDA. Como mencionado anteriormente, já foi evidenciado que o NMDA está ligado aos A $\beta$ Os, através de ensaio de coimunoprecipitação em sinaptossomas de córtex (RENNER *et al.*, 2010), e que, quando utilizado um anticorpo anti-NR1 (a subunidade mais expressa do NMDA) foi verificada a diminuição da ligação destes oligômeros em dendritos dos neurônios hipocampais (DE FELICE *et al.*, 2007). Em outro estudo, foi demonstrada a ligação de A $\beta$ Os com afinidade nanomolar à PrPC, e ainda que anticorpos anti-PrPC reduzem a ligação de A $\beta$ Os aos neurônios e preservam a plasticidade sináptica (LAURÉN *et al.*, 2009). Em nosso trabalho, um comportamento parecido para o TRPA1 nas células primárias de neurônios hipocampais foi observado. Ademais, o fato de o antagonista bloquear 40 % da ligação de A $\beta$ Os pode também indicar que a ativação deste receptor é necessária para a ligação dos oligômeros em outros sítios, ou outros receptores, não necessariamente dependendo da interação direta de A $\beta$ Os e TRPA1. A ideia de que ocorre uma interação entre um conjunto de receptores, formando um complexo, do qual o TRPA1 faria parte, e que este é necessário para a ligação e propagação do efeito dos A $\beta$ Os nas sinapses, é então reforçada. De fato, uma revisão recente propôs uma complexa interação entre A $\beta$ Os e receptores e, de maneira muito similar ao que havíamos proposto anteriormente em nossa tabela (Tabela 7), classifica os diferentes receptores para os A $\beta$ Os de forma estilizada e refinada (DE STROOPER; KARRAN, 2016). É importante observar que alguns receptores são alvos de debate intenso e de muitas controvérsias, por exemplo, a citada anteriormente PrPC. Assim como alguns trabalhos já demonstraram que esta

proteína parece ser alvo dos A $\beta$ Os (CAETANO *et al.*, 2011; LAURÉN *et al.*, 2009), outros estudos demonstraram que animais knockout para PrPC são igualmente suscetíveis aos A $\beta$ Os (BALDUCCI *et al.*, 2010) ou, ainda, que a expressão aumentada de PrPC previne o déficit de memória induzido por A $\beta$ Os (RIAL *et al.*, 2012). Este conjunto de resultados, bem como o suporte da literatura, nos permite inferir que o receptor TRPA1 não é essencial para a ligação dos A $\beta$ Os às sinapses, porém, esta ideia não determina que ele seja dispensável. Aparentemente, o TRPA1 extrasináptico pode estar participando do processo de indução de toxicidade. Mesmo que, o TRPA1 não seja vital para a ligação dos A $\beta$ Os, a sua ativação direta e, provavelmente, sua ativação indireta parecem contribuir de maneira significativa para a toxicidade induzida por estes oligômeros.

**Tabela 7. Revisão dos receptores que já foram propostos como alvo para os AβOs.**

Receptor	Referência
<b>RAGE</b>	YAN <i>et al.</i> , 1996; STURCHLER <i>et al.</i> , 2008
<b>p75 NTR</b>	YAAR <i>et al.</i> , 1997
<b>α7 nAChR</b>	WANG <i>et al.</i> , 2000; MAGDESIAN <i>et al.</i> , 2005
<b>FPR2</b>	TIFFANY <i>et al.</i> , 2001; HE <i>et al.</i> , 2013
<b>RAMPs</b>	JHAMANDAS <i>et al.</i> , 2003; JHAMANDAS; MACTAVISH 2012
<b>NMDARs</b>	LACOR <i>et al.</i> , 2007; DE FELICE <i>et al.</i> , 2007
<b>Frizzled</b>	MAGDESIAN <i>et al.</i> , 2008
<b>PrPC</b>	LAUREN <i>et al.</i> , 2009
<b>AMPARs</b>	ZHAO <i>et al.</i> , 2010
<b>mGluR5</b>	RENNER <i>et al.</i> , 2010
<b>EphB2</b>	CISSÉ <i>et al.</i> , 2011
<b>Canal de cálcio P/Q</b>	MEZLER <i>et al.</i> , 2012
<b>Neurologina</b>	DINAMARCA <i>et al.</i> , 2012
<b>LilrB2</b>	KIM <i>et al.</i> , 2013
<b>α 1 adrenérgico</b>	HAASE <i>et al.</i> , 2013
<b>FcγRIIb</b>	KAM <i>et al.</i> , 2013

**RAGE**= receptor para produtos finais de glicação avançada, do inglês; *Receptor for Advanced Glycation Endproducts*. **p75 NTR**= receptor P75 para neurotrofinas, do inglês; p75 Neurotrophin Receptor. **α7 nAChR**= recptor α7 nicotínico para a acetilcolina, do inglês; *α7 nicotinic Acetylcholine Receptor*. **FPR2**= receptor de peptídeos formil do tipo 2, do inglês; *Formyl peptide receptor 2*. **RAMPs**= proteínas modificadores da atividade dos receptores para amilina, do inglês; *Receptor Activity Modifying Proteins for amylin*. **NMDARs**= receptores glutamatérgicos de N-metil-(D)-aspartato. **Frizzled**= receptores para proteínas WNT. **PrPC**= proteína prion celular. **AMPARs**= receptores glutamatérgicos de alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico. **mGluR5**= receptor metabotrópico para o glutamate subtipo 5, do inglês; *metabotropic Glutamate Receptor subtype 5*. **EphB2**= receptor de tirosina quinase EphB2, do inglês; *Ephrin type-B receptor 2*. **LilrB2**= receptores de imunoglobulinas subfamília B membro 2, do inglês; *Leukocyte Immunoglobulin-like receptor subfamily B member 2*. **FcγRIIb**= receptores de imunoglobulinas Fc da família gama tipo IIb (CD32), do inglês; *Fc-gamma Receptors immunoglobulin superfamily type IIb*.

As evidências que apontam um papel do receptor TRPA1 na ligação de A $\beta$ Os, mas não essencial, somadas ao fato de que o bloqueio deste receptor induziu expressiva redução da toxicidade, levou-nos a considerar a relação íntima entre o TRPA1 e os A $\beta$ Os. Desejávamos expandir nosso conhecimento em relação a este receptor, bem com encontrar evidências que pudessem ser biologicamente relevantes, e não apenas estatisticamente significantes. Através da utilização de diferentes modelos experimentais, procuramos encontrar dados aplicáveis e replicáveis da participação do TRPA1 na DA, visando não restringir nossos resultados a características exclusivas, ou particulares, de um modelo animal ou de uma condição simulada. Para tanto, utilizamos cultura celular primária de neurônios e microglias de ratos tratados com A $\beta$ Os<sub>40</sub> e A $\beta$ Os<sub>42</sub>, camundongos *Swiss* sadios injetados por via i.c.v. com A $\beta$ Os<sub>40</sub> e A $\beta$ Os<sub>42</sub>, camundongos transgênicos (TG) 5x*FAD* e, ainda cérebros de humanos portadores da DA. Em todos os experimentos foram utilizados os respectivos controles de idade e gênero. Nossos resultados mostraram que ocorre, inicialmente, redistribuição de TRPA1 nas células neuronais, frente a exposição aos A $\beta$ Os, mostrada por análises de imunocitoquímica. Como controle, foram avaliadas a capacidade da anisomicina – um inibidor proteico – de interferir na expressão de TRPA1 através de ensaios de fluorescência de processos dendríticos. Os receptores de insulina, por exemplo, parecem sofrer o efeito contrário ao observado para o TRPA1, após um curto período de exposição aos A $\beta$ Os; ocorre diminuição destes receptores nos dendritos e acúmulo no soma neuronal (ZHAO *et al.*, 2008). No caso da PrPC, por exemplo, um estudo evidenciou um aumento da expressão e aglomeração desta proteína na superfície de células



hipocampais frente a exposição aos A $\beta$ Os (CAETANO *et al.*, 2011). Em comparação, para o TRPA1 parece que ocorre um ajuste celular principalmente nas primeiras horas de exposição aos A $\beta$ Os. De fato, a exposição aos A $\beta$ Os pode causar impactos distintos nas células neuronais, ao passo que ocorre diminuição ou aumento de determinados receptores, conforme o tempo de exposição. Ainda, mostramos que ocorre intenso aumento de expressão de TRPA1 nas células microgliais. Estas células são reconhecidas por atuarem no processo neuroinflamatório (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016). Além disso, esse aumento é independente da sequência do peptídeo utilizado, visto que, ambos A $\beta$ Os<sub>40</sub> e A $\beta$ Os<sub>42</sub> induziram incremento na expressão de TRPA1 microglial. Divergências de opiniões/hipóteses ocorrem acerca da toxicidade produzida por A $\beta$ Os<sub>40</sub> e A $\beta$ Os<sub>42</sub>. Ambos os peptídeos são formados da clivagem da APP (GOLDE; ECKMAN; YOUNKIN, 2000). Entretanto, o peptídeo de fração 1-40 é formado com maior frequência, ao passo que a fração 1-42 parece ser mais tóxica, por apresentar uma maior capacidade de oligomerização (GOLDE; ECKMAN; YOUNKIN, 2000; SUZUKI *et al.*, 1994). Aqui foi mostrado que ambas as frações promoveram toxicidade, porém os oligômeros preparados a partir da fração 1-40 (A $\beta$ Os<sub>40</sub>) foram utilizados em maior concentração, corroborando a ideia da diferença de toxicidade entre os peptídeos. Um estudo prévio relatou que anticorpos contra ambas as sequências – 1-40 ou 1-42 – atenuam o acúmulo de A $\beta$  (LEVITES *et al.*, 2006). Ressaltamos ainda que, neste estudo, os A $\beta$ Os provenientes das duas sequências distintas promoveram resultados fidedignos e replicáveis. A exposição dos astrócitos aos A $\beta$ Os não promoveu nenhuma alteração na expressão de TRPA1, lembrando que estas células em condições basais já não

expressavam este receptor. Estes foram os primeiros indicativos *in vitro* de que ocorre uma regulação positiva da expressão de TRPA1 nos neurônios e na microglia frente ao estímulo com os A $\beta$ Os.

A injeção i.c.v. de A $\beta$ Os<sub>40</sub> promoveu em animais Swiss, um aumento da expressão de TRPA1 no hipocampo e no córtex (como descrito anteriormente, regiões afetadas durante a progressão da DA). Este aumento foi significativo após 24 horas e aparentemente manteve-se por até 14 dias da sua administração. Conforme já foi demonstrado, a principal ativação do processo inflamatório induzido por A $\beta$ Os<sub>40</sub> ocorre após 24 horas da injeção destes oligômeros (BICCA *et al.*, 2011; MEDEIROS *et al.*, 2007, 2010; PASSOS *et al.*, 2009, 2010; PREDIGER *et al.*, 2008). Como o processo inflamatório no SNC é extremamente dependente da microglia (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016), inferimos que os dados *in vitro* para o aumento de expressão de TRPA1 na microglia dão suporte para estes novos dados *ex vivo*. Ainda, quando avaliados os cérebros de camundongos 5xFAD TG e seus respectivos controles, quanto à imunomarcação para o TRPA1 e também para A $\beta$  – no hipocampo e córtex – verifica-se uma clara diferença entre controles (WT) e TG. Mais uma vez, foi verificada expressão elevada de TRPA1 em ambas as regiões encefálicas dos animais 5xFAD TG, em comparação aos WT, e este fator é acompanhado por acúmulo de A $\beta$  nos encéfalos destes animais. Corroborando, os animais 5xFAD TG apresentam intensa produção e acúmulo de A $\beta$ Os e placas fibrilares insolúveis de A $\beta$  (GIRARD *et al.*, 2014). Dando maior subsídio ao papel da neuroinflamação e da microglia neste contexto, estudos mostraram que nesses animais TG o processo neuroinflamatório é importante, tendo em vista que, a inibição deste processo é benéfica (MALM *et*

*al.*, 2015; SPANGENBERG *et al.*, 2016). Possivelmente, o achado que vem consolidar a exacerbação de TRPA1 em ambientes ricos em A $\beta$ Os – o principal aspecto abordado neste bloco de resultados – é o que trata da expressão de TRPA1 em encéfalos de pacientes humanos. Os experimentos mostraram que há uma expressão aumentada de TRPA1 no córtex dos pacientes portadores da DA, quando comparados ao córtex de pacientes idosos não-dementes (ND), utilizados como controle. Adicionalmente, há expressão de TRPA1 em níveis basais no cerebelo dos pacientes controles, e que esta expressão não difere nos pacientes portadores da DA. Evidências similares, em relação à presença de TRPA1 e A $\beta$  no cerebelo, foram encontradas para os animais TG. Torna-se então essencial explicar aqui a necessidade da avaliação do cerebelo nestas análises. Como já mencionada anteriormente, a DA é considerada uma doença de especificidade anatomopatológica – que afeta regiões específicas do encéfalo relacionadas à memória – e, já foi demonstrado que no cerebelo raramente ocorre produção e/ou acúmulo de A $\beta$ Os, bem como formação de placas fibrilares de A $\beta$  (LACOR *et al.*, 2004). Desta forma, foram realizadas neste trabalho análises no cerebelo, utilizadas como controle da doença, em todas as amostras de animais TG e pacientes humanos. Um dado original apresentado aqui é a expressão aumentada de TRPA1 em diferentes cenários, nos quais há maior ocorrência de oligômeros. A habilidade dos A $\beta$ Os de promover modificações conformacionais e alteração da expressão de receptores é reconhecida (para revisão ver VIOLA; KLEIN, 2015). De maneira interessante, em ambas as situações em que ocorre acúmulo progressivo de A $\beta$ Os – nos encéfalos dos animais 5xFAD TG e dos portadores da DA – ocorre

expressão aumentada de TRPA1. Consistente com o fato de que o aumento da expressão de TRPA1 é dependente do acúmulo de A $\beta$ Os, e não da presença de placas fibrilares de A $\beta$ , quando os animais Swiss foram injetados com A $\beta$ Os uma única vez, o aumento da expressão de TRPA1 foi relevante. Os resultados da avaliação da relação entre TRPA1 e A $\beta$ Os nos permitem deduzir que a expressão de TRPA1 é dependente do acúmulo de A $\beta$ Os, e que, conseqüentemente, a toxicidade induzida por estes oligômeros é maior em situações em que ocorre expressão aumentada deste receptor.

Outras particularidades instigantes resultaram da avaliação da relação do TRPA1 com os A $\beta$ Os. Quando foram avaliadas as fatias dos encéfalos dos animais 5xFAD TG, encontramos o receptor TRPA1 expresso em níveis neuronais circundando, principalmente, o corpo neuronal da camada piramidal e granular do hipocampo. Os dados *in vitro* também subsidiam este achado. Observamos ainda que os oligômeros de A $\beta$  apresentavam-se atacando os neurônios – em “puncta”, uma característica dos oligômeros menores e solúveis – porém, grandes agregados de oligômeros foram também encontrados. Mais surpreendente foi o fato de que, em parte, estes grandes agregados de A $\beta$ Os estavam recobertos por intensa marcação de TRPA1.

O processo neuroinflamatório está evidente durante a progressão da DA em humanos, e também em modelos experimentais genéticos (MINTER; TAYLOR; CRACK, 2016). Uma das características da neuroinflamação é a ativação microglial (PROKOP; MILLER; HEPPNER, 2013; TAKEDA; SATO; MORISHITA, 2014). O receptor TRPA1 é amplamente envolvido em diferentes condições inflamatórias (BARABAS; KOSSYREVA; STUCKY, 2012; STRAUB,

2014). Adicionalmente, nossos achados *in vitro* evidenciaram a expressão de TRPA1 na microglia e sua expressão aumentada frente a exposição aos A $\beta$ Os. No caso desta análise histopatológica das fatias dos encéfalos dos animais TG, todas as evidências nos levaram a considerar a expressão de TRPA1 na microglia, que por sua vez estaria circundando, ou atacando, os grandes agregados de A $\beta$ Os. Aqui reportamos que o TRPA1 está expresso na microglia, que ataca não somente os grandes agregados de A $\beta$ Os, mas também os oligômeros menores solúveis. Outra questão importante a ser abordada é a que trata da distinção dos grandes agregados de A $\beta$ Os das placas fibrilares insolúveis de A $\beta$ . Os anticorpos anti-A $\beta$ Os, utilizados para a realização dos ensaios apresentados neste trabalho, ligam-se aos oligômeros solúveis de A $\beta$ , com muito baixa afinidade por monômeros, ou fibrilas de A $\beta$ . Quando estes anticorpos foram testados em cérebros de pacientes portadores da DA, também foi demonstrada uma marcação aumentada destes oligômeros nestes tecidos (KAYED *et al.*, 2003; LAMBERT *et al.*, 2007). Destacamos que os grandes agregados de A $\beta$ Os são diferentes das placas de A $\beta$ , como demonstrado pela imunomarcação para A $\beta$ Os, seguida de contracoloração com Thio-S, pois foram evidenciados centros densos de A $\beta$  fibrilar (corados com Thio-S), que são recobertos pelos A $\beta$ Os de forma difusa. Este foi um dos primeiros resultados originados por esta tese e que já estão publicados (VIOLA *et al.*, 2015). Uma vez mais, o somatório destes resultados sugerem que são os A $\beta$ Os ao invés das placas fibrilares que são relevantes para a determinação da distribuição de TRPA1 e a consequente progressão da doença.

O desenrolar dos experimentos mostrou-nos que o TRPA1 aparecia como um ator principal na toxicidade

induzida pelos A $\beta$ Os, levantando a pergunta: - Esta participação do TRPA1 interferiria, de fato, no desempenho cognitivo dos animais? A perda da memória é o principal sintoma da DA (MATTSON, 2004), e a capacidade dos A $\beta$ Os de produzirem déficits cognitivos tem sido descrita em diferentes modelos experimentais (BICCA *et al.*, 2011; BOMFIM *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2015; FIGUEIREDO *et al.*, 2011, 2013; FORNY-GERMANO *et al.*, 2014; LEDO *et al.*, 2013; MEDEIROS *et al.*, 2007; PREDIGER *et al.*, 2008). Os resultados aqui apresentados corroboram, uma vez mais, os achados da literatura, ao demonstrarem que os A $\beta$ Os induziram déficit cognitivo, avaliado tanto pelo teste do RO quanto pelo *step down*. Ambas as tarefas são dependentes do hipocampo e do córtex, tendo em vista que evocam pistas espaciais, porém o teste do *step down* apresenta um importante componente emocional, dependente também da amígdala (CANTO-DE-SOUZA; MATTIOLI, 2016; ZANATTA *et al.*, 1997). Contudo além de apresentar um papel crucial em processos relacionados à memória, o hipocampo está envolvido também na regulação de processos relacionados à emoção e modulação do comportamento (FANSELOW; DONG, 2010). O bloqueio dos receptores TRPA1, através do uso do antagonista HC030031, preveniu a perda cognitiva induzida pelos A $\beta$ Os<sub>40</sub> nos dois testes realizados. Resultados recentes do nosso grupo de pesquisa mostraram achados similares, decorrentes do bloqueio de receptores de bradicinina B<sub>2</sub> (BICCA *et al.*, 2015). Este dado se torna relevante pelo fato de já ter sido descrita a ativação indireta de receptores TRPA1 por sinais dependentes da fosfolipase C (PLC) (ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012; BANDELL *et al.*, 2004), e este é o caso de via de sinalização ativada pelo receptor B<sub>2</sub>. Estes resultados comportamentais foram interpretados

como uma confirmação funcional de que a toxicidade induzida pelos A $\beta$ Os é dependente da ativação de TRPA1, considerando que o bloqueio prévio destes receptores impediu a instalação dos déficits de memória. Objetivando confirmar estes resultados usando uma abordagem não farmacológica, foram também utilizados no experimento seguinte camundongos que apresentavam deleção gênica para o receptor TRPA1 (KO), injetados com A $\beta$ Os<sub>42</sub> e avaliados no RO. Os resultados mostraram que os animais TRPA1 KO que receberam A $\beta$ Os apresentaram um dano cognitivo similar, ou até mesmo pior, ao do que o dos animais WT que receberam A $\beta$ Os. Estes resultados ressaltaram questões importantes a serem consideradas. Primeiramente, a importância basal da expressão de TRPA1, visto que, embora estes animais não apresentem nenhuma deficiência motora, ou de qualquer capacidade, que seja visível, a ausência completa de receptores TRPA1 pode ser vital em momentos de exposição à agentes inflamatórios, como no caso dos A $\beta$ Os. O que levou também a considerar o papel fundamental do TRPA1 na microglia, que são células imprescindíveis ao ataque a patógenos, e que, poderiam estar comprometidas na ausência de TRPA1. Receptores essenciais para a circuitaria da memória apresentam características familiares, como no caso de receptores muscarínicos e NMDA que, quando inibidos de forma basal, também produzem prejuízos cognitivos (BENVENGA; SPAULDING, 1988; GLICK; ZIMMERBERG, 1972; MCLAMB *et al.*, 1990; MONDADORI *et al.*, 1989). Outra hipótese seria a de que pudesse ocorrer compensação nestes animais, pela qual outros TRPs poderiam ser expressados em níveis maiores para compensar a ausência do TRPA1, tais como TRPV1, TRPM2 ou TRPM8; já descritos

anteriormente por interagirem com o receptor TRPA1 (GARRISON; STUCKY, 2011). Este conjunto de resultados nos permite concluir que o TRPA1 é um receptor essencial para o processo de cognição, visto que tanto a sua ativação, quanto a sua depleção, são prejudiciais.

Após analisar estes dados comportamentais relevantes e ponderar sobre os aspectos aos quais o receptor TRPA1 parece exercer importante influência, principalmente o fato de que a expressão deste receptor está extremamente aumentada em condições de acúmulo de A $\beta$ Os, pareceu-nos plausível considerar o possível efeito benéfico do tratamento com o antagonista do receptor TRPA1 em modelos experimentais da DA. Da mesma maneira que a injeção de A $\beta$ Os produz déficits cognitivos, como citado anteriormente, os déficits de memória em outros modelos experimentais, incluindo os animais 5xFAD TG, também já foram reportados (KIMURA; OHNO, 2009; WEBSTER *et al.*, 2014). Neste trabalho, demonstramos que o tratamento por via oral com HC, durante 14 dias, promoveu uma melhora dos déficits cognitivos já instalados 14 dias após a injeção de A $\beta$ Os<sub>40</sub> ou A $\beta$ Os<sub>42</sub>. Os nossos achados parecem ser consistentes, visto que utilizando os animais 5xFAD TG – um modelo crônico que mimetiza melhor a DA – a perda de memória acentuada no RO, que também é acompanhada de patologia exacerbada, foi substancialmente melhorada com o tratamento por via oral com o HC030031, durante 60 dias. Neste contexto, propomos que a perda da memória é atribuída aos A $\beta$ Os e que o resgate da memória pode ser atribuído ao bloqueio dos receptores TRPA1, sugerindo que o antagonismo deste receptor consiste em uma abordagem benéfica considerável para o tratamento da DA.



Esta bem estabelecida e descrita a relação estreita entre a falha e/ou perda das sinapses e a progressão da DA (para revisão ver WALSH; SELKOE, 2004). De fato, a perda sináptica é o evento da DA que melhor se correlaciona com a progressão da doença e a perda da memória (TERRY *et al.*, 1991). A deterioração de sinapses é encontrada tanto em modelos animais, quanto em humanos portadores da DA, e independente da presença de placas fibrilares de A $\beta$  (MUCKE *et al.*, 2000). Nossos resultados mostram que os A $\beta$ Os, de ambas as sequências, induzem efeitos deletérios sobre as sinapses. Neste trabalho foram utilizadas duas metodologias distintas, *Western blotting* e microscopia eletrônica de transmissão (MET). A avaliação da proteína pré-sináptica sinaptofisina, como um marcador sináptico, é reconhecida (EDELMANN *et al.*, 1995) e já descrita pelo nosso grupo de pesquisa por estar diminuída na presença de A $\beta$ Os<sub>40</sub> (BICCA *et al.*, 2011; FIGUEIREDO *et al.*, 2011). Neste mesmo contexto, um outro estudo mostrou, através de MET, a diminuição de espinhas dendríticas (pós-sinapses) em dois diferentes modelos animais transgênicos para DA, incluindo os animais 5xFAD (HONGPAISAN; SUN; ALKON, 2011). Considerando estas informações, terapias que possam melhorar ou impedir a perda da memória e proteger as sinapses poderiam representar uma possível alternativa para auxiliar no tratamento da DA. Estendendo de maneira relevante os nossos achados comportamentais, demonstramos aqui que o tratamento oral com HC promoveu melhoras nos animais que receberam A $\beta$ Os, tanto em nível pré-sináptico quanto pós-sináptico, evidenciando mais um benefício decorrente do bloqueio dos receptores TRPA1. Como já mencionado anteriormente, é a presença de A $\beta$ Os, não de placas amilóides, que está relacionada às falhas e perdas

sinápticas observadas na DA, e que melhor se correlaciona com a perda da memória (LACOR *et al.*, 2004; LUBLIN; GANDY, 2010; SCHNABEL, 2011). Ao encontro desta afirmação nosso resultado mostra claramente a redução da presença de placas de A $\beta$ , mas principalmente, declínio drástico dos A $\beta$ Os, na região hipocampal dos animais 5xFAD TG tratados por via oral por 60 dias com HC. Mesmo que esteja claro que as placas fibrilares de A $\beta$  pouco se relacionam com a perda da memória, a avaliação da redução de placas é muito comum nos estudos que tentam provar a eficácia de terapias para o tratamento da DA, em modelos transgênicos (FENG *et al.*, 2004; GROSSI *et al.*, 2009; HONGPAISAN; SUN; ALKON, 2011; SHENG; PRICE; KOLIATSOS, 2002; SUBAIEA *et al.*, 2015; YAMAMOTO *et al.*, 2007). Em concordância com todas as evidências acima expostas, estudos clínicos de fase 3 foram desapontadores, visto que a terapia com anticorpos anti-A $\beta$  agravaram o déficit cognitivo dos pacientes. Um estudo incentivado por estes dados relatou que animais TG, modelos da DA, tratados com anticorpos anti-A $\beta$  – como terapia – apresentaram redução acentuada do número de placas fibrilares de A $\beta$ , porém, a piora da disfunção neuronal (BUSCHE *et al.*, 2015). Sugerimos aqui que a avaliação do acúmulo de oligômeros seria uma medida muito mais fidedigna, e que justificaria de forma mais confiável os resultados obtidos no comportamento. Estes resultados permitem sugerir que o bloqueio dos receptores TRPA1 estaria ajudando na manutenção do acúmulo de oligômeros, por sua vez, favorecendo a integridade sináptica, e isto – aliado a uma soma de outros fatores que não foram aqui averiguados – por consequência, resultaria em uma melhora da memória.

Após a instalação do quadro inflamatório e do

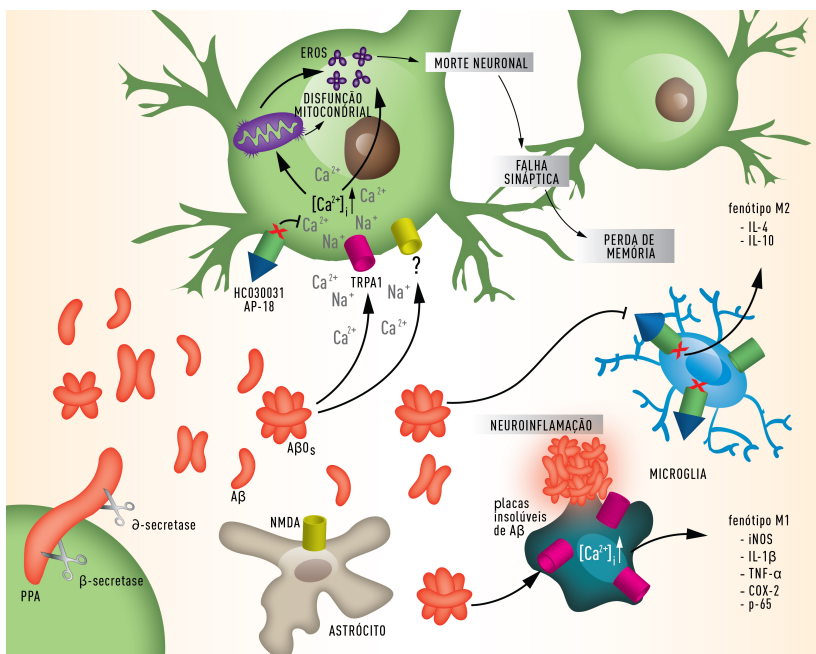
estresse oxidativo, características importantes para a progressão da DA, torna-se difícil acreditar que o papel benéfico do TRPA1 seja atribuído apenas à sua capacidade de impedir a toxicidade neuronal. Considerando os dados anteriores demonstrados, que indicam a presença de TRPA1 na microglia atacando tanto as placas fibrilares de A $\beta$  quanto as formas solúveis de A $\beta$ Os. Ainda, o dado expressivo acerca do aumento de TRPA1 nestas células, frente a exposição aos A $\beta$ Os, reforçando a noção de que a microglia seria um importante alvo, contribuindo de modo influente para o efeito benéfico observado. De fato, a ativação microglial representa uma importante ferramenta para o processo neuroinflamatório, e contribui para a progressão da DA (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016; MINTER; TAYLOR; CRACK, 2016), como já foi enfatizado anteriormente neste trabalho. Nos últimos anos, o estudo da mudança de fenótipo dos macrófagos em diferentes condições patológicas tem ganhado grande atenção (HEILBRONN; CAMPBELL, 2008; JOHNSON; NEWBY, 2009; OLAH *et al.*, 2011; WEIGERT; BRÜNE, 2008). Sabe-se que o macrófago em um perfil pró-inflamatório, M1, ou também denominado clássico, é capaz de produzir e liberar uma variedade de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$ ; expressar enzimas como iNOS e NOX (NADPH oxidases) e produzir intermediários tóxicos como EROS e ERNS (espécies reativas de nitrogênio), ao passo que a produção de citocinas anti-inflamatórias é suprimida. Por outro lado, o macrófago que apresenta um perfil anti-inflamatório, M2, ou também chamado alternativo, produz citocinas anti-inflamatórias como IL-10, IL-4, IL-13, e TGF- $\beta$ ; e assume este perfil na tentativa de promover resolução da inflamação, imunomodulação, homeostase e angiogênese, por

exemplo, em detrimento da produção de citocinas pró-inflamatórias (para revisão ver VARNUM; IKEZU, 2012). Um trabalho pioneiro demonstrou que a alteração do perfil fenotípico microglial – de M2 para M1 – é determinada pelo envelhecimento, ou seja, maior produção e acúmulo de A $\beta$ Os, nos animais transgênicos PS1<sub>M146L</sub>/APP<sub>751SL</sub>, modelos da DA (JIMENEZ *et al.*, 2008). É importante salientar que, conforme demonstramos aqui os A $\beta$ Os parecem induzir um perfil pró-inflamatório, visto que as microglias tratadas com estes oligômeros apresentaram intensa expressão e/ou ativação de marcadores como iNOS e p-65/NF $\kappa$ B, além de baixa expressão de IL-10. Já o tratamento com os antagonistas do TRPA1, tanto o HC quanto o AP-18, parecem induzir mudança de fenótipo microglial para um perfil M2 anti-inflamatório. Observamos um aumento de expressão de IL-10 em detrimento da ativação de p-65/NF $\kappa$ B e expressão de iNOS. Desta forma, este resultado preliminar pode sugerir que a alteração de fenótipo microglial induzida pelo bloqueio dos receptores TRPA1, presentes na microglia, apareceria como um importante mecanismo de modulação que auxiliaria a microglia na manutenção do acúmulo de oligômeros, e, por consequência, favoreceria a integridade sináptica e a memória. Em concordância com este raciocínio, em um estudo utilizando camundongos 5xFAD TG, modelos da DA, no qual foi realizada a inibição microglial, foi reportada a atenuação da perda de espinhas dendríticas e da morte neuronal e a melhora da memória, avaliada em testes comportamentais. No entanto, não foram detectadas alterações nos níveis de A $\beta$  solúvel ou em placas (SPANGENBERG *et al.*, 2016). Todas estas evidências, somadas aos resultados aqui apresentados, parecem ser de grande valia, uma vez que a alteração do fenótipo microglial poderia ser uma das etapas

responsáveis por impulsionar as melhoras comportamentais e sinápticas, descritas anteriormente. Neste sentido, o antagonismo do receptor TRPA1 apareceria como uma vantagem sobre a total inibição da microglia, visto que o tratamento com HC, também promoveu uma redução acentuada dos A $\beta$ Os, o que num contexto geral, pode oferecer maiores benefícios para o tratamento da DA.

Até o presente momento não existem evidências na literatura da participação do receptor TRPA1 na doença de Alzheimer. Deste modo, o presente trabalho de tese foi desenvolvido visando relacionar o envolvimento deste receptor na iniciação e progressão da DA. Baseados nos dados obtidos durante a realização deste trabalho, e na literatura que embasou e propiciou a realização de cada experimento, propomos em um desenho esquemático simplificado, o papel do receptor TRPA1 na toxicidade induzida por oligômeros de A $\beta$  (Fig. 53). Após a formação dos oligômeros de A $\beta$ , sejam eles de sequência 1-40 ou 1-42, estes ligam-se diretamente ao receptor TRPA1 promovendo a sua ativação com consequente entrada de Ca $^{2+}$  intracelular. Ainda, os receptores TRPA1 podem ser ativados de maneira indireta, ou seja, os A $\beta$ Os ligam-se à outros receptores – um possível candidato seria o receptor NMDA – e a ativação destes receptores levaria, por consequência, à ativação de TRPA1. A resultante principal em ambos os cenários possíveis, é o excesso intracelular de íons Ca $^{2+}$ , que é reconhecidamente descrito como um fator prejudicial à célula. O excesso de íons Ca $^{2+}$  poderia promover uma série de eventos deletérios para os neurônios, dentre eles a sobrecarga mitocondrial, culminando em alteração do PMM e perda de capacidade funcional, o que seria um fator contribuinte para a formação de EROS exacerbada. A soma destes e

de outros fatores poderiam caracterizar o processo de estresse oxidativo que, somado ao intenso processo inflamatório, decorrente da deposição de A $\beta$ Os no espaço extracelular, induziriam uma perda de responsividade neuronal, caracterizada inicialmente como uma falha sináptica, e posteriormente, morte. Estes eventos, claramente, interferem no desempenho cognitivo e por conseguinte são essenciais para a manifestação do principal sintoma da DA, a perda da memória. Acontecendo simultaneamente, como mencionado anteriormente, está o processo inflamatório que, ao menos em parte significativa, é dependente das citocinas e fatores de transcrição pró-inflamatórios ativados nas células microgliais. Os nossos resultados preliminares indicam que a ativação de TRPA1 nestas células – que já está em expressão aumentada frente a exposição aos A $\beta$ Os – caracterizaria um perfil M1, ou pró-inflamatório. Evocado inicialmente na tentativa de eliminar o agente perturbador, neste caso os A $\beta$ Os e que, após a perda do controle do processo inflamatório, atuaria preferencialmente como um vilão, contribuindo para instalação dos danos sinápticos e cognitivos. A visão geral deste quadro facilita a compreensão do efeito benéfico do antagonismo dos receptores TRPA1, em duas células diferentes que acreditamos ser da maior importância em dois momentos distintos. Em um momento inicial, na redução da toxicidade neuronal. Em um momento mais tardio na contribuição da mudança de fenótipo microglial, para um perfil anti-inflamatório, que estaria contribuindo para a reinstalação da homeostase e favorecendo a melhora do ambiente celular, o que, em grande parte, poderia ser o motivo das melhoras comportamentais e bioquímicas observadas com o tratamento utilizando o antagonista do TRPA1.



**Figura 53. Desenho esquemático do papel do receptor TRPA1 na toxicidade induzida por AβOs.** AβOs se ligam ao TRPA1, ou a outros receptores, que por sua vez podem conduzir à ativação de TRPA1. Em resposta, ocorre o aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que contribui para o desbalanço das funções mitocondriais e aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROS). O dano oxidativo leva à toxicidade neuronal culminando em morte celular, e contribuindo para a falha sináptica e perda de memória. Ainda, o processo de dano neuronal é amparado por microglias pró-inflamatórias (fenótipo M1), que podem ser ativadas direta ou indiretamente pelos AβOs.





## 6. SUMÁRIO DE RESULTADOS

- O receptor TRPA1 é expresso em neurônios e microglias no encéfalo;
- O receptor TRPA1 é relevante para a toxicidade induzida por A $\beta$ Os;
- O receptor TRPA1 é importante, mas não determinante, para a ligação dos A $\beta$ Os aos dendritos;
- O acúmulo de A $\beta$ Os causa impacto sobre a expressão do TRPA1;
- O receptor TRPA1 é essencial para o déficit cognitivo induzido por A $\beta$ Os;
- O antagonismo do receptor TRPA1 apresenta efeitos benéficos em modelos animais relacionados a DA;



## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Com a realização deste trabalho de tese levantamos algumas hipóteses, e realizamos os experimentos possíveis e passíveis para testá-las. Contudo, restam ainda questões a serem respondidas, relacionadas ao mecanismo de indução da toxicidade do receptor TRPA1 na DA, e para isso outras pesquisas serão necessárias.

## **8. CONCLUSÃO**

Nossos resultados demonstram, através de diferentes modelos experimentais, que o TRPA1 parece estar envolvido em diferentes estágios da progressão da DA, abrindo desta maneira, uma nova janela para estudo, no cenário complexo da DA e, destacando um novo e potencial alvo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais efetivas para a doença de Alzheimer.



## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, P; CUNHA, R A; OLIVEIRA, C. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Current Pharmaceutical Design**. v. 16, n. 25, p. 2766-2778, 2010.

AGUIAR, A S et al. Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling. **Mechanisms of Ageing and Development**. v. 132, n. 11-12, p. 560-567, 1 dez. 2011.

ALLSOP, D et al. Immunohistochemical evidence for the derivation of a peptide ligand from the amyloid beta-protein precursor of Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 85, n. 8, p. 2790-2794, abr. 1988.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2015 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**. v. 11, n. 3, p. 332-384, mar. 2015.

ANDERSSON, D A et al. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. **The Journal of Neuroscience**. v. 28, n. 10, p. 2485-2494, 5 mar. 2008.

ANDRADE, E L et al. TRPA1 receptor modulation attenuates bladder overactivity induced by spinal cord injury. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**. v. 300, n. 5, p. F1223-F1234, maio 2011.

ANDRADE, E L; MEOTTI, F C; CALIXTO, J B. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 133, n. 2, p. 189-204, fev. 2012.

AVENALI, L et al. Annexin A2 regulates TRPA1-dependent nociception. **The Journal of Neuroscience**. v. 34, n. 44, p. 14506-14516, 29 out. 2014.

BALDUCCI, C et al. Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 107, n. 5, p. 2295-2300, 2 fev. 2010.

BANDELL, M et al. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**. v. 41, n. 6, p. 849-857, 25 mar. 2004.

BARABAS, M E; KOSSYREVA, E A; STUCKY, C L. TRPA1 is functionally expressed primarily by IB4-binding, non-peptidergic mouse and rat sensory neurons. **Plos One**. v. 7, n. 10, p. e47988, 25 out. 2012.

BAUTISTA, D M et al. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 102, n. 34, p. 12248-12252, 23 ago. 2005.

BENVENGA, M J; SPAULDING, T C. Amnesic effect of the novel anticonvulsant MK-801. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**. v. 30, n. 1, p. 205-207, maio 1988.

BICCA, M A et al. B<sub>2</sub> receptor blockage prevents A $\beta$ -induced cognitive impairment by neuroinflammation inhibition. **Behavioural Brain Research**. v. 278, p. 482-491, 1 fev. 2015.

BICCA, M A et al. The selective and competitive N-methyl- D-aspartate receptor antagonist, (-)- 6-phosphonomethyl- deca-hydroisoquinoline- 3-carboxylic acid, prevents synaptic toxicity induced by amyloid- $\beta$  in mice. **Neuroscience**. v. 192, p. 631-641, 29 set. 2011.

BISHOP, N A; LU, T; YANKNER, B A. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. **Nature**. v. 464, n. 7288, p. 529-535, 25 mar. 2010.

BOMFIM, T R et al. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease- associated A $\beta$  oligomers. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 122, n. 4, p. 1339-1353, abr. 2012.

BOURNE, J; HARRIS, K M. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? **Current Opinion in Neurobiology**. v. 17, n. 3, p. 381-386 , jun. 2007.

BRIERLEY, S M et al. TRPA1 contributes to specific mechanically activated currents and sensory neuron mechanical hypersensitivity. **The Journal of Physiology**. v. 589, n. Pt 14, p. 3575-3593, 15 jul. 2011.

BUSCHE, M A et al. Decreased amyloid- $\beta$  and increased neuronal hyperactivity by immunotherapy in Alzheimer's models. **Nature Neuroscience**. v. 18, n. 12, p.1725-1727, dez. 2015.

CADENAS, E; DAVIES, K J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 29, n. 3-4, p. 222-230, ago. 2000.

CAETANO, F A et al. Amyloid-beta oligomers increase the localization of prion protein at the cell surface. **Journal of Neurochemistry**. v. 117, n. 3, p. 538-553, maio 2011.

CANTO-DE- SOUZA, L; MATTIOLI, R. The consolidation of inhibitory avoidance memory in mice depends on the intensity of the aversive stimulus: The involvement of the amygdala, dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex. **Neurobiology of Learning and Memory**. v. 130, p. 44-51, 2 fev. 2016.

CASPERSEN, C et al. Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. **The FASEB Journal**. v. 19, n. 14, p. 2040-2041, 1 dez. 2005.

CATERINA, M J. Chemical biology: Sticky spices. **Nature**. v. 445, n. 7127, p. 491-492, 1 fev. 2007a.

CATERINA, M J. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 292, n. 1, p. R64-R76, jan. 2007b.

CHEN, J et al. Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity. **Nature Communications**. v. 4, p. 2501, 2013.



CISSE, M et al. Reversing EphB2 depletion rescues cognitive functions in Alzheimer model. **Nature**. v. 469, n. 7328, p. 47-52, 6 jan. 2011.

COHEN, A D et al. Using Pittsburgh Compound B for in vivo PET imaging of fibrillar amyloid-beta. **Advances in Pharmacology**. v. 64, p. 27-81, 2012.

CONVERTINO, M et al. 9,10-Anthraquinone hinders beta-aggregation: how does a small molecule interfere with Abeta-peptide amyloid fibrillation? **Protein Science**. v. 18, n. 4, p. 792-800, abr. 2009.

COSSARIZZA, A et al. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 197, n. 1, p. 40- 45, 30 nov. 1993.

DA COSTA, D S et al. The involvement of the transient receptor potential A1(TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. **Pain**. v. 148, n. 3, p. 431-437, mar. 2010.

DAI, Y et al. Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 117, n. 7, p. 1979- 987, jul. 2007.

DAVIES, P; MALONEY, A J. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. **The Lancet**. v. 2, n. 8000, p. 1403, 25 dez. 1976.

DE FELICE, F G et al. Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl- D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 282, n. 15, p. 11590-11601, 13 abr. 2007.

DE FELICE, F G et al. Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by Abeta oligomers. **Neurobiology of Aging**. v.9, n. 9, p. 1334-1347, set. 2008.

DE FELICE, F G et al. Targeting the neurotoxic species in Alzheimer's disease: inhibitors of Abeta oligomerization. **The FASEB Journal**. v. 18, n. 12, p. 1366-1372, set. 2004.

DE STROOPER, B; KARRAN, E. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. **Cell**. v. 164, n. 4, p. 603-615, 11 fev. 2016.

DECKER, H et al. N-methyl- D-aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic amyloid- $\beta$  peptide oligomers. **Journal of Neurochemistry**. v. 115, n. 6, p. 1520-1529, dez. 2010.

DEL CAMINO, D et al. TRPA1 contributes to cold hypersensitivity. **The Journal of Neuroscience**. v. 30, n. 45, p. 15165-15174, 10 nov. 2010.

DESAI, A K; GROSSBERG, G T. Diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. **Neurology**. v. 64, n. 12 Suppl 3, p. S34-S39, 28 jun. 2005.

DINAMARCA, M C; RÍOS, J A; INESTROSA, N C. Postsynaptic Receptors for Amyloid- $\beta$  Oligomers as Mediators of Neuronal Damage in Alzheimer's Disease. **Frontiers in physiology**. v. 3, p. 464 , 20 dez. 2012.

DISABATO, D; QUAN, N; GODBOUT, J P. Neuroinflammation: The Devil is in the Details. **Journal of Neurochemistry**, 15 mar. 2016.

DODD, P R et al. A rapid method for preparing synaptosomes: comparison, with alternative procedures. **Brain Research**. v. 226, n. 1-2, p. 107-118, 7 dez. 1981.

DORSZEWSKA, J et al. Molecular basis of familial and sporadic Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**, 14 mar. 2016.

EDELMANN, L et al. Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. **The EMBO Journal**. v.14, n. 2, p. 224-231, 16 jan. 1995.

EID, S R et al. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. **Molecular Pain**. v. 4, p. 48, 27 out. 2008.

EMERIT, J; EDEAS, M; BRICAIRE, F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 58, n. 1, p. 39-46, jan. 2004.

FANSELOW, M S; DONG, H W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**. v. 65, n. 1, p. 7-19, 14 jan. 2010.

FENG, Z et al. Melatonin alleviates behavioral deficits associated with apoptosis and cholinergic system dysfunction in the APP 695 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Journal of Pineal Research**. v. 37, n. 2, p. 129-136, set.2004.

FERREIRA, S T et al. Soluble amyloid- $\beta$  oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**. v. 9, p. 191, 26 maio 2015.

FERREIRA, S T; KLEIN, W L. The A $\beta$  oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Learning and Memory**. v. 96, n. 4, p. 529-543, nov. 2011.

FERREIRA-VIEIRA, T H et al. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. **Current neuropharmacology**. v. 14, n. 1, p. 101-115, 2016.

FIFRE, A et al. Microtubule-associated protein MAP1A, MAP1B, and MAP2 proteolysis during soluble amyloid beta-peptide- induced neuronal apoptosis. Synergistic involvement of calpain and caspase-3. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 281, n. 1, p. 229-240, 6 jan. 2006.

FIGUEIREDO, C P et al. Folic acid plus  $\alpha$ -tocopherol mitigates amyloid- $\beta$ -induced neurotoxicity through modulation of mitochondrial complexes activity. **Journal of Alzheimer's Disease**. v. 24, n. 1, p. 61-75, 2011.

FIGUEIREDO, C P et al. Memantine rescues transient cognitive impairment caused by high-molecular- weight  $A\beta$  oligomers but not the persistent impairment induced by low-molecular- weight oligomers. **The Journal of Neuroscience**. v. 33, n. 23, p. 9626-9634, 5 jun. 2013.

FILLIT, H et al. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**. v. 129, n. 2, p. 318-320, 19 ago. 1991.

FJELL, A M et al. What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus. **Progress in Neurobiology**. v. 117, p. 20-40, jun. 2014.

FORNY-GERMANO, L et al. Alzheimer's disease-like pathology induced by amyloid- $\beta$  oligomers in nonhuman primates. **The Journal of Neuroscience**. v.34, n. 41, p. 13629-13643, 8 out. 2014.

FRANCIS, P T. Glutamatergic systems in Alzheimer's disease. **International Journal of Geriatric Psychiatry**. v. 18, n. Supl 1, p. S15-S21, set. 2003.

GALLUZZI, L; BLOMGREN, K; KROEMER, G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. **Nature Reviews Neuroscience**. v. 10, n. 7, p. 481-494, jul. 2009.

GARRISON, S R; STUCKY, C L. The dynamic TRPA1 channel: a suitable pharmacological pain target? **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v. 12, n.10, p. 1689-1697, out. 2011.

GIRARD, S D et al. Onset of hippocampus-dependent memory impairments in 5XFAD transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Hippocampus**. v. 24, n.7, p. 762-772, jul. 2014.

GLENNER, G G et al. The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. **Applied pathology**. v. 2, n. 6, p. 357-369, 1984.

GLICK, S D; ZIMMERBERG, B. Amnesic effects of scopolamine. **Behavioral Biology**. v. 7, n. 2, p. 245-254, abr. 1972.

GOLDE, T E; ECKMAN, C B; YOUNKIN, S G. Biochemical detection of A $\beta$  isoforms: implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**. v. 1502, n. 1, p. 172-187, jul. 2000.

GONG, Y et al. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 100, n. 18, p. 10417-10422, 2 set. 2003.

GROSSI, C et al. Clioquinol decreases amyloid-beta burden and reduces working memory impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**. v. 17, n. 2, p. 423-440, 2009.

GRUNDKE-IQBAL, I et al. Abnormal phosphorylation of the microtubule- associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 83, n. 13, p. 4913-4917, jul. 1986.

HAASE, N et al. Amyloid- $\beta$  peptides activate  $\alpha$ 1-adrenergic cardiovascular receptors. **Hypertension**. v. 62, n. 5, p. 966-972 , nov. 2013.

HAASS, C. Take five-- BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. **The EMBO Journal**. v. 23, n. 3, p. 483-488, 11 fev. 2004.

HAGA, S; AKAI, K; ISHII, T. Demonstration of microglial cells in and around senile (neuritic) plaques in the Alzheimer brain. An immunohistochemical study using a novel monoclonal antibody. **Acta Neuropathologica**. v. 77, n. 6, p. 569-575, 1 jan. 1989.

HAN, S H; MOOK-JUNG, I. Diverse molecular targets for therapeutic strategies in Alzheimer's disease. **Journal of Korean Medical Science**. v. 29, n. 7, p. 893-902, 11 jul. 2014.

HARDY, J A; HIGGINS, G A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science (New York)**. v. 256, n. 5054, p. 184-185, 10 abr. 1992.

HE, N et al. Amyloid- $\beta$ (1-42) oligomer accelerates senescence in adult hippocampal neural stem/progenitor cells via formylpeptide receptor 2. **Cell death & disease**. v. 4, p. e924 , 21 nov. 2013.

HEILBRONN, L K; CAMPBELL, L V. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. **Current Pharmaceutical Design**. v. 14, n. 12, p. 1225-1230, 2008.

HENSLEY, K et al. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. **Journal of Neurochemistry**. v. 65, n. 5, p. 2146-2156, nov. 1995.

HILL, K; SCHAEFER, M. Ultraviolet light and photosensitising agents activate TRPA1 via generation of oxidative stress. **Cell Calcium**. v. 45, n. 2, p. 155-164, fev. 2009.

HOLTZMAN, D M; MANDELKOW, E; SELKOE, D J. Alzheimer disease in 2020. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**. v. 2, n. 11, 1 nov. 2012.

HONGPAISAN, J; SUN, M K; ALKON, D L. PKC  $\epsilon$  activation prevents synaptic loss, A $\beta$  elevation, and cognitive deficits in Alzheimer's disease transgenic mice. **The Journal of Neuroscience**. v. 31, n. 2, p. 630-643, 12 jan. 2011.

HOPPER, M W; VOGEL, F S. The limbic system in Alzheimer's disease. A neuropathologic investigation. **The American Journal of Pathology**. v. 85, n. 1, p. 1-20, out. 1976.

IBGE. Dados do Censo 2010. (<http://seriesestatisticas.ibge.gov.br>) acessado em Março de 2015.



INGRAM, D K et al. Rodent models of memory dysfunction in Alzheimer's disease and normal aging: moving beyond the cholinergic hypothesis. **Life Sciences**. v. 55, n. 25-26, p. 2037-2049, 1994.

ITTNER, L M; GÖTZ, J. Amyloid- $\beta$  and tau-- a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. **Nature Reviews Neuroscience**. v. 12, n. 2, p. 65-72, 1 fev. 2011

JANG, M H et al. Resveratrol oligomers from *Vitis amurens* attenuate beta-amyloid-induced oxidative stress in PC12 cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 30, n. 6, p. 1130-1134, jun. 2007.

JANSSEN, Y M et al. Cell and tissue responses to oxidative damage. **Laboratory Investigation**. v. 69, n. 3, p. 261-274, 1 set. 1993.

JAQUEMAR, D; SCHENKER, T; TRUEB, B. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 274, n. 11, p. 7325- 7333, 12 mar. 1999.

JHAMANDAS, J H et al. Human amylin actions on rat cholinergic basal forebrain neurons: antagonism of beta-amyloid effects. **Journal of Neurophysiology**. v. 89, n. 6, p. 2923-2930 , jun. 2003.

JHAMANDAS, J H; MACTAVISH, D.  $\beta$ -Amyloid protein ( $A\beta$ ) and human amylin regulation of apoptotic genes occurs through the amylin receptor. **Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death**. v. 17, n. 1, p. 37-47 , jan. 2012.

JIANG, L H; GAMPER, N; BEECH, D J. Properties and therapeutic potential of transient receptor potential channels with putative roles in adversity: focus on TRPC5, TRPM2 and TRPA1. **Current Drug Targets**. v. 12, n. 5, p. 724-736, maio 2011.

JIMENEZ, S et al. Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. **The Journal of Neuroscience**. v. 28, n. 45, p. 11650-11661, 5 nov. 2008.

JOHNSON, J L; NEWBY, A C. Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques. **Current opinion in lipidology**. v. 20, n. 5, p. 370-378, out. 2009.

JOHNSON, K A et al. Appropriate use criteria for amyloid PET: a report of the Amyloid Imaging Task Force, the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, and the Alzheimer's Association. **Alzheimer's & Dementia**. v. 9, n. 1, p.e-1, jan. 2013.

JORDT, S E et al. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. **Nature**. v. 427, n. 6971, p. 260-265, 15 jan. 2004.

KAECH, S; BANKER, G. Culturing hippocampal neurons. **Nature Protocols**. v. 1, n. 5, p. 2406-2415, 2006.

KAM, T I et al. FcγRIIb mediates amyloid-β neurotoxicity and memory impairment in Alzheimer's disease. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 123, n. 7, p. 2791-2802, jul. 2013.

KANG, K et al. Analysis of Drosophila TRPA1 reveals an ancient origin for human chemical nociception. **Nature**. v. 464, n. 7288, p. 597-600, 25 mar. 2010.

KAYED, R et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. **Science (New York)**. v. 300, n. 5618, p.486-489, 18 abr. 2003.

KILKENNY, C et al. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. **PLoS Biology**. v. 8, n. 6, p. e1000412, 29 jun. 2010.

KIM, S; HWANG, S W. Emerging roles of TRPA1 in sensation of oxidative stress and its implications in defense and danger. **Archives of Pharmacal Research**. v. 36, n. 7, p. 783-791, jul. 2013.

KIM, T et al. Human LILRB2 is a  $\beta$ -amyloid receptor and its murine homolog PirB regulates synaptic plasticity in an Alzheimer's model. **Science (New York)** .v.341, n. 6152, p. 1399-1404, 20 set. 2013.

KIM, Y S et al. Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in the rat trigeminal sensory afferents and spinal dorsal horn. **The Journal of Comparative Neurology**. v. 518, n. 5, p. 687-698, 1 mar. 2010.

KIMURA, R; OHNO, M. Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. **Neurobiology of Disease**. v. 33, n. 2, p. 229-235, fev. 2009.

KITAZAWA, M; MEDEIROS, R; LAFERLA, F M. Transgenic mouse models of Alzheimer disease: developing a better model as a tool for therapeutic interventions. **Current Pharmaceutical Design**. v. 18, n. 8, p. 1131-1147, 2012.

KLEIN, W L; KRAFFT, G A; FINCH, C E. Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? **Trends in Neurosciences**. v. 24, n. 4, p. 219-224, abr. 2001.

KLUNK, W E et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. **Annals of Neurology**. v. 55, n. 3, p. 306-319, 1 mar. 2004.

KOSUGI, M et al. Activation of TRPA1 channel facilitates excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. **The Journal of Neuroscience**. v. 27, n. 16, p. 4443-4451, 18 abr. 2007.

KUO, Y M et al. Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 271, n. 8, p. 4077-4081, 23 fev. 1996.

KWAN, K Y et al. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. **Neuron**. v. 50, n. 2, p.277-289, 20 abr. 2006.

LACOR, P N et al. Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. **The Journal of Neuroscience**. v. 24, n. 45, p. 10191-10200, 10 nov.2004.

LACOR, P N et al. Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. **The Journal of Neuroscience**. v. 27, n. 4, p. 796-807, 24 jan. 2007.

LAFERLA, F M; GREEN, K N; ODDO, S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. **Nature Reviews Neuroscience**. v. 8, n. 7, p. 499-509, jul. 2007.

LAMBERT, M P et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 95, n. 11, p. 6448- 6453, 26 maio 1998.

LAMBERT, M P et al. Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of Abeta. **Journal of Neurochemistry**. v. 100, n. 1, p. 23-35, jan. 2007.

LANNERT, H; HOYER, S. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. **Behavioral Neuroscience**. v. 112, n. 5, p. 1199-1208, out. 1998.

LAURÉN, J et al. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. **Nature**. v. 457, n. 7233, p. 1128-1132, 26 fev. 2009.

LAURSEN, S E; BELKNAP, J K. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. **Journal of Pharmacological Methods**. v. 16, n. 4, p. 355-357, dez. 1986.

LEBEL, C P et al. Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 104, n. 1, p. 17-24, 1 jun.1990.

LEDO, J H et al. Amyloid- $\beta$  oligomers link depressive-like behavior and cognitive deficits in mice. **Molecular Psychiatry**. v. 18, n. 10, p. 1053-1054, out. 2013.

LERNER, J. Intellectual property and development at WHO and WIPO. **American Journal of Law & Medicine**. v. 34, n. 2-3, p. 257-277, 2008.

LEVITES, Y et al. Anti-A $\beta$ 42- and anti-A $\beta$ 40-specific mAbs attenuate amyloid deposition in an Alzheimer disease mouse model. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 116, n. 1, p. 193-201, jan. 2006.

LOERCH, P M et al. Evolution of the aging brain transcriptome and synaptic regulation. **Plos One**. v. 3, n. 10, p. e3329, 2 out. 2008.

LUBLIN, A L; GANDY, S. Amyloid-beta oligomers: possible roles as key neurotoxins in Alzheimer's Disease. **The Mount Sinai Journal of Medicine, New York**. v. 77, n. 1, p. 43-49, fev. 2010.

MACPHERSON, L J et al. An ion channel essential for sensing chemical damage. **The Journal of Neuroscience**. v. 27, n. 42, p. 11412-11415, 17 out. 2007.

MACPHERSON, L J et al. The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. **Current Biology**. v. 15, n. 10, p. 929-934, 24 maio 2005.

MAGDESIAN, M H et al. Peptide blockers of the inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by amyloid beta. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 280, n. 35, p. 31085-31090, 2 set. 2005.

MAGDESIAN, M H et al. Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 283, n. 14, p. 9359-9368, 4 abr. 2008.

MALM, T et al. Activation of the nuclear receptor PPAR $\delta$  is neuroprotective in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease through inhibition of inflammation. **Journal of Neuroinflammation**. v. 12, p. 7, 16 jan. 2015.

MALSCH, P et al. Deletion of interleukin-6 signal transducer gp130 in small sensory neurons attenuates mechanonociception and down-regulates TRPA1 expression. **The Journal of Neuroscience**. v. 34, n. 30, p. 9845-9856, 23 jul. 2014.

MATTSON, M P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature**. v. 430, n. 7000, p. 631-639, 5 ago. 2004.

MCGEER, P L et al. Immune system response in Alzheimer's disease. The Canadian Journal of Neurological Sciences. **Le Journal Canadien des Sciences Neurologiques**. v. 16, n. 4 Suppl, p. 516-527, nov. 1989.

MCGEER, P L; MCGEER, E G. Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease. **Journal of Neurovirology**. v. 8, n. 6, p. 529-538, dez. 2002.

MCLAMB, R L et al. MK-801 impedes the acquisition of a spatial memory task in rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**. v. 37, n. 1, p. 41-45, set.1990.

MEDEIROS, R et al. Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. **The Journal of Neuroscience**. v. 27, n. 20, p. 5394-5404, 16 maio 2007.

MEDEIROS, R et al. The role of TNF-alpha signaling pathway on COX-2 upregulation and cognitive decline induced by beta-amyloid peptide. **Behavioural Brain Research**. v. 209, n. 1, p. 165-173, 1 maio 2010.

MEZLER, M et al. A  $\beta$ -amyloid oligomer directly modulates P/Q-type calcium currents in *Xenopus* oocytes. **British Journal of Pharmacology**. v. 165, n. 5, p. 1572-1583 , mar. 2012.

MINTER, M R; TAYLOR, J M; CRACK, P J. The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**. v. 136, n. 3, p. 457-474, fev. 2016.

MONDADORI, C et al. NMDA receptor antagonists can enhance or impair learning performance in animals. **Experimental Brain Research**. v. 75, n. 3, p.449-456, 1 jan. 1989.



MONTELL, C. The TRP superfamily of cation channels. **Science's STKE:Signal Transduction Knowledge Environment**. v. 2005, n. 272, p. re3, 22 fev. 2005.

MORALES, I et al. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. **Frontiers in Cellular Neuroscience**. v. 8, p. 112, 22 abr. 2014.

MOUNT, C; DOWNTON, C. Alzheimer disease: progress or profit? **Nature Medicine**. v. 12, n. 7, p. 780-784, jul. 2006.

MUCKE, L et al. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. **The Journal of Neuroscience**. v. 20, n. 11, p. 4050-4058, 1 jun.2000.

NAKAMURA, S et al. Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta(1-42)-amyloid peptide. **Brain Research**. v. 912, n. 2, p. 128-136, 7 set. 2001.

NEELY, G G et al. TrpA1 regulates thermal nociception in Drosophila. **Plos One**. v. 6, n. 8, p. e24343, 31 ago. 2011.

NYBORG, A C et al. In Vivo and Ex Vivo Imaging of Amyloid- $\beta$  Cascade Aggregates with a Pronucleon TM Peptide. **Journal of Alzheimer's Disease**, 15 jan. 2013.

OBATA, K et al. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 115, n. 9, p. 2393-2401, set. 2005.

OLAH, M et al. Microglia phenotype diversity. **CNS & Neurological Disorders Drug Targets**. v. 10, n. 1, p. 108-118, fev. 2011.

OSTAPCHENKO, V G et al. The Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) Channel Contributes to  $\beta$ -Amyloid Oligomer-Related Neurotoxicity and Memory Impairment. **The Journal of Neuroscience**. v. 35, n. 45, p. 15157-15169 11 nov. 2015.

PASSOS, G F et al. Involvement of phosphoinositide 3-kinase gamma in the neuro-inflammatory response and cognitive impairments induced by beta- amyloid 1-40 peptide in mice. **Brain, Behavior and Immunity**. v. 24, n. 3, p.493-501, 1 mar. 2010.

PASSOS, G F et al. Role of the macrophage inflammatory protein-1alpha/CC chemokine receptor 5 signaling pathway in the neuroinflammatory response and cognitive deficits induced by beta-amyloid peptide. **The American Journal of Pathology**. v. 175, n. 4, p. 1586-1597, out. 2009.

PERRY, E K et al. Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. **British Medical Journal**. v. 2, n. 6150, p. 1457-1459, 25 nov. 1978.

POIRIER, J. Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**. v. 26, n. 3, p. 355-361, 1 mar. 2005.

PORAT, Y; ABRAMOWITZ, A; GAZIT, E. Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. **Chemical Biology & Drug Design**. v. 67, n. 1, p. 27-37, jan. 2006.

PORCELLOTTI, S et al. Oxidative Stress during the Progression of  $\beta$ -Amyloid Pathology in the Neocortex of the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Oxidative medicine and cellular longevity**. v. 2015, p. 967203, 20 abr. 2015.

PREDIGER, R D et al. Differential susceptibility following beta-amyloid peptide- (1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. **Behavioural Brain Research**. v. 177, n. 2, p. 205-213, 27 fev. 2007.

PREDIGER, R D et al. Genetic deletion or antagonism of kinin B(1) and B(2) receptors improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. **Neuroscience**. v. 151, n. 3, p. 631-643, 6 fev. 2008.

PRICE, D L; SISODIA, S S. Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. **Annual Review of Neuroscience**. v. 21, p. 479-505, 1998.

PROKOP, S; MILLER, K R; HEPPNER, F L. Microglia actions in Alzheimer's disease. **Acta Neuropathologica**. v. 126, n. 4, p. 461-477, out. 2013.

RENNER, M et al. Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. **Neuron**. v. 66, n. 5, p. 739-754, 10 jun. 2010.

RIAL, D et al. Overexpression of cellular prion protein (PrP(C)) prevents cognitive dysfunction and apoptotic neuronal cell death induced by amyloid- $\beta$  ( $A\beta_{1-40}$ ) administration in mice. **Neuroscience**. v. 215, p. 79-89, 26 jul. 2012.

ROCK, R B et al. Role of microglia in central nervous system infections. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 17, n. 4, p. 942-64, table of contents, out. 2004.

ROMANO, B et al. The cannabinoid TRPA1 agonist cannabichromene inhibits nitric oxide production in macrophages and ameliorates murine colitis. **British Journal of Pharmacology**. v. 169, n. 1, p. 213-229, maio 2013.

SATTLER, R; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. **Journal of Molecular Medicine**. v. 78, n. 1, p. 3-13, 2000.

SAUNDERS, A M et al. Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases. **The Lancet**. v.342, n. 8873, p. 710-711, 18 set. 1993.

SAWADA, Y et al. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. **The European Journal of Neuroscience**. v. 27, n. 5, p. 1131-1142, mar. 2008.

SCHNABEL, J. Amyloid: little proteins, big clues. **Nature**. v. 475, n. 7355, p. S12-S14, 14 jul. 2011.

SCOTT, W K et al. Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. **The Lancet**. v. 347, n. 9009, p. 1186-1187, 27 abr. 1996.

SELKOE, D J. Alzheimer's disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. v. 3, n. 7, 1 jul. 2011.

SELKOE, D J. Amyloid beta protein precursor and the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Cell**. v. 58, n. 4, p. 611-612, 25 ago. 1989.

SELKOE, D J. The therapeutics of Alzheimer's disease: where we stand and where we are heading. **Annals of Neurology**. v. 74, n. 3, p. 328-336, set. 2013.

SHANKAR, G M et al. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. **Nature Medicine**. v. 14, n. 8, p. 837-842, ago. 2008.

SHARMA, M; GUPTA, Y K. Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. **Life Sciences**. v. 68, n. 9, p. 1021-1029, 19 jan. 2001.

SHEFER, V F. Hippocampal pathology as a possible factor in the pathogenesis of senile dementias. **Neuroscience and Behavioral Physiology**. v. 8, n. 3, p. 236-239, set. 1977.

SHENG, J G; PRICE, D L; KOLIATSOS, V E. Disruption of corticocortical connections ameliorates amyloid burden in terminal fields in a transgenic model of Abeta amyloidosis. **The Journal of Neuroscience**. v. 22, n. 22, p. 9794-9799, 15 nov. 2002.

SHERRINGTON, R et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. **Nature**. v. 375, n. 6534, p. 754-760, 29 jun. 1995.

SHIGETOMI, E et al. TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. **Nature Neuroscience**. v. 15, n. 1, p.70-80, jan. 2012.

SIMIONI, C et al. Effects of brefeldin A on the endomembrane system and germ tube formation of the tetraspore of *Gelidium floridanum* (Rhodophyta, Florideophyceae). **Journal of Phycology**. v. 50, n. 3, p. 577-586, jun. 2014.

SPANGENBERG, E E et al. Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid- $\beta$  pathology. **Brain: A Journal of Neurology**, 26 fev. 2016.

SPONNE, I et al. Apoptotic neuronal cell death induced by the non-fibrillar amyloid-beta peptide proceeds through an early reactive oxygen species- dependent cytoskeleton perturbation. **The Journal of Biological Chemistry**. v.278, n. 5, p. 3437-3445, 31 jan. 2003.

STORY, G M et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**. v. 112, n. 6, p. 819-829, 21 mar.2003.

STRAUB, R H. TRPV1, TRPA1, and TRPM8 channels in inflammation, energy redirection, and water retention: role in chronic inflammatory diseases with an evolutionary perspective. **Journal of Molecular Medicine**. v. 92, n. 9, p. 925-937, set. 2014.

STRITTMATTER, W J et al. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 90, n. 17, p. 8098-8102, 1 set. 1993.

STURCHLER, E et al. Site-specific blockade of RAGE-Vd prevents amyloid-beta oligomer neurotoxicity. **The Journal of Neuroscience**. v. 28, n. 20, p. 5149-5158 , 14 maio 2008.

SUBAIEA, G M et al. Reduction of amyloid- $\beta$  deposition and attenuation of memory deficits by tolfenamic acid. **Journal of Alzheimer's Disease**. v. 43, n. 2, p. 425-433, 2015.

SUI, F et al. Cinnamaldehyde up-regulates the mRNA expression level of TRPV1 receptor potential ion channel protein and its function in primary rat DRG neurons in vitro. **Journal of Asian Natural Products Research**. v. 12, n. 1, p. 76-87, jan. 2010.

SULTANA, R; BUTTERFIELD, D A. Oxidatively modified, mitochondria-relevant brain proteins in subjects with Alzheimer disease and mild cognitive impairment. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**. v. 41, n. 5, p. 441-446, out. 2009.

SUZUKI, N et al. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. **Science (New York)**. v. 264, n. 5163, p. 1336-1340, 27 maio 1994.

TAKAHASHI, N et al. Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. **Channels**. v. 2, n. 4, p. 287-298, ago. 2008.

TAKEDA, S et al. Validation of Abeta1-40 administration into mouse cerebroventricles as an animal model for Alzheimer disease. **Brain Research**. v.1280, p. 137-147, 14 jul. 2009.

TAKEDA, S; SATO, N; MORISHITA, R. Systemic inflammation, blood-brain barrier vulnerability and cognitive/non-cognitive symptoms in Alzheimer disease: relevance to pathogenesis and therapy. **Frontiers in Aging Neuroscience**. v. 6, p. 171, 29 jul. 2014.

TAKEUCHI, T; DUSZKIEWICZ, A J; MORRIS, R G. The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. **Series B, Biological Sciences**. v. 369, n. 1633, p. 20130288 , 5 jan. 2014.



TALAVERA, K et al. Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1. **Nature Neuroscience**. v. 12, n. 10, p. 1293-1299, out. 2009.

TERI, L et al. Behavioral disturbance, cognitive dysfunction, and functional skill. Prevalence and relationship in Alzheimer's disease. **Journal of the American Geriatrics Society**. v. 37, n. 2, p. 109-116, 1 fev. 1989.

TERRY, R D et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. **Annals of Neurology**. v. 30, n. 4, p. 572-580, out. 1991.

TIFFANY, H L et al. Amyloid-beta induces chemotaxis and oxidant stress by acting at formylpeptide receptor 2, a G protein-coupled receptor expressed in phagocytes and brain. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 276, n. 26, p. 23645-23652, 29 jun. 2001.

TÓTH, A et al. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. **Brain research. Molecular Brain Research**. v. 135, n. 1-2, p. 162-168, 27 abr. 2005.

VAN DAM, D; DE DEYN, P P. Drug discovery in dementia: the role of rodent models. **Nature Reviews . Drug Discovery**. v. 5, n. 11, p. 956-970, nov. 2006.

VANDEWAUW, I; OWSIANIK, G; VOETS, T. Systematic and quantitative mRNA expression analysis of TRP channel genes at the single trigeminal and dorsal root ganglion level in mouse. **BMC Neuroscience**. v. 14, p. 21, 14 fev. 2013.

VARNUM, M M; IKEZU, T. The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**. v. 60, n. 4, p. 251-266, ago. 2012.

VENKATACHALAM, K; MONTELL, C. TRP channels. **Annual Review of Biochemistry**. v. 76, p. 387-417, 2007.

VIANA, F; FERRER-MONTIEL, A. TRPA1 modulators in preclinical development. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. v. 19, n. 12, p. 1787-1799, dez. 2009.

VIOLA, K L et al. Towards non-invasive diagnostic imaging of early-stage Alzheimer's disease. **Nature Nanotechnology**. v. 10, n. 1, p. 91-98, jan. 2015.

VIOLA, K L; KLEIN, W L. Amyloid  $\beta$  oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. **Acta Neuropathologica**. v. 129, n. 2, p. 183-206, fev. 2015.

VISWANATH, V et al. Opposite thermosensor in fruitfly and mouse. **Nature**. v. 423, n. 6942, p. 822-823, 19 jun. 2003.

WALLACE, J E; KRAUTER, E E; CAMPBELL, B A. Animal models of declining memory in the aged: short-term and spatial memory in the aged rat. **Journal of Gerontology**. v. 35, n. 3, p. 355-363, maio 1980.

WALSH, D M; SELKOE, D J. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. **Neuron**. v. 44, n. 1, p. 181-193, 30 set. 2004.

WANG, H Y et al. beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 275, n. 8, p. 5626-5632, 25 fev. 2000.

WANG, J et al. TRPC6 specifically interacts with APP to inhibit its cleavage by  $\gamma$ -secretase and reduce A $\beta$  production. **Nature Communications**. v. 6, p. 8876, 19 nov. 2015.

WEBSTER, S J et al. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. **Frontiers in Genetics**. v. 5, p. 88, 23 abr. 2014.

WEIGERT, A; BRÜNE, B. Nitric oxide, apoptosis and macrophage polarization during tumor progression. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**. v. 19, n. 2, p. 95-102, set. 2008.

WILCOX, K C et al. Nanoscale Synaptic Membrane Mimetic Allows Unbiased High Throughput Screen That Targets Binding Sites for Alzheimer's-Associated A $\beta$  Oligomers. **Plos One**. v. 10, n. 4, p. e0125263, 30 abr. 2015.

WILDE, G J; SUNDSTRÖM, L E; IANNOTTI, F. Propidium iodide in vivo: an early marker of neuronal damage in rat hippocampus. **Neuroscience Letters**. v. 180, n. 2, p. 223-226, 24 out. 1994.

WISNIEWSKI, H M et al. Diffuse, lake-like amyloid-beta deposits in the paraventricular layer of the presubiculum in Alzheimer disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**. v. 57, n. 7, p. 674-683, 1 jul. 1998.

WYSS-CORAY, T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? **Nature Medicine**. v. 12, n. 9, p. 1005-1015, 1 set. 2006.

YAAR, M et al. Binding of beta-amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A possible mechanism for Alzheimer's disease. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 100, n. 9, p. 2333-2340, 1 nov. 1997.

YAMAMOTO, M et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha regulate amyloid-beta plaque deposition and beta-secretase expression in Swedish mutant APP transgenic mice. **The American Journal of Pathology**. v. 170, n. 2, p. 680-692, fev. 2007.

YAMAMOTO, S et al. Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1772, n. 8, p. 958-967, ago. 2007.

YAN, S D et al. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. **Nature**. v. 382, n. 6593, p. 685-691, 22 ago. 1996.

ZANATTA, M S et al. Involvement of the hippocampus, amygdala, entorhinal cortex and posterior parietal cortex in memory consolidation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 30, n. 2, p. 235-240, fev. 1997.

ZHAO, W Q et al. Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. **The FASEB Journal**. v. 22, n. 1, p. 246-260, jan. 2008.

ZHAO, W Q et al. Inhibition of calcineurin-mediated endocytosis and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors prevents amyloid beta oligomer-induced synaptic disruption. **The Journal of Biological Chemistry** v. 285, n. 10, p. 7619-7632 , 5 mar. 2010.



# ANEXO A

6/6/2011

notes.ufsc.br/aplic/ceua.nsf/48fc5b9fe99...

Resultado de Solicitação de Protocolo

**Protocolo**

PP00625

**Título**

AValiação DAS ALTERAÇÕES NEUROINFLAMATÓRIAS E EXCITOTOXICAS INDUZIDAS PELO PEPTÍDEO BETA-AMILÓIDE IN VIVO E IN VITRO

**Data de Entrada**

16/05/2011

**Resultado:**

Aprovado

**Data / Prazo**

03/06/2011

**Considerações**

Ofício n.º 85/CEUA/PRPE/2011

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) João Batista Calixto, Departamento de Farmacologia - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos, para a utilização de cento e trinta e dois *Rattus norvegicus*; trezentos e noventa e seis camundongos suíços; trinta e seis camundongos C57/BL6; vinte e quatro camundongos nocautes B1 e vinte e quatro camundongos nocautes B2.

- Procedência do animal: LAFEX e biotério central da UFSC

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

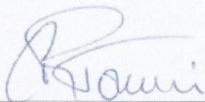
Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 03/09/2013

Data 06/06/2011

Parecer(es):



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - PRPE - UFSC  
PRESIDENTE


...ufsc.br/.../6b40bf3e2000aa88832578a7...

1/2





## ANEXO B

<b>Office for the Institutional Animal Care and Use Committee</b>	Northwestern University 259 H. Lake Shore Drive Suite #10 Chicago, Illinois 60611  aacc@northwestern.edu Phone 312 503 9333 Fax 312 503 0112	 <b>NORTHWESTERN UNIVERSITY</b>
---	---	---

February 26, 2014

William L. Klein  
Department of Neurobiology  
2205 Tech Drive, Hogan 4-150/160  
Evanston Campus


Protocol: 2014-3406  
Title: A Novel, Nanoparticle-based Molecular MRI Probe for Early Alzheimer's  
Diagnostics

Approved Animal Numbers/Species: 599 Mice  
Funding Source: NIH (R21 AG045637)

The Northwestern University Animal Care and Use Committee (NUACUC) approved the use of animals on the ASP referenced above for the three year period 2/26/2014 through 2/25/2017.

Northwestern University has an Animal Welfare Assurance on file with the Office of Laboratory Animal Welfare (A3283-01). Northwestern University conducts its reviews in accordance with United States Public Health Service (USPHS) regulations and applicable federal and local laws. The composition of the NUACUC meets the requirements of the USPHS policy and the Animal Welfare Act Regulations.

For the Committee,



CJ Heckman, PhD  
Chair, IACUC

/mv

cc: CCM

